

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Regulación de la actividad neuronal mediada por astrocitos en la porción medial de la amígdala central.

Tesis Doctoral

Mario Martín Fernández

Madrid, 2018

Resumen tesis doctoral: **Regulación de la actividad neuronal mediada por astrocitos en la porción medial de la amígdala central.**

Habiéndose observado un importante papel de la sinapsis tripartita en distintas regiones del sistema nervioso, nuestro primer objetivo fue elucidar el papel de los astrocitos en la modulación de la transmisión sináptica en la amígdala. Para ello primero investigamos la comunicación neurona-astrocito, estudiando cómo la actividad neuronal puede influir la señal de calcio intracelular en los astrocitos, y posteriormente la comunicación astrocito-neurona, estudiando cómo la actividad astrocitaria influye en la actividad sináptica y neuronal.

El segundo objetivo fue el estudio de la implicación de los astrocitos en el sistema endocanabinoide en la amígdala central, determinando si los astrocitos de este área responden mediante la activación de receptores CB1 a la liberación de endocannabinoides, y si esta activación produce efectos en la transmisión sináptica, elucidando si, como en otras áreas, el astrocito es un elemento activo en el sistema endocanabinoide de la amígdala central.

Se conoce el papel de las células de glía sobre distintas sinapsis pertenecientes a distintas poblaciones neuronales, habiéndose observado diversos efectos de la actividad astrocitaria en distintas poblaciones pertenecientes a distintas áreas del sistema nervioso central, pero aún no se ha elucidado el efecto de la activación de los astrocitos sobre distintas sinapsis en la misma población neuronal. Por eso nuestro tercer objetivo fue estudiar la modulación sobre distintas sinapsis con una valencia opuesta -como las sinapsis excitadoras e inhibitoras- de una misma población neuronal.

Se ha estudiado el papel de las células de la glía en la conducta dependiente de regiones del sistema nervioso central como el hipocampo, la corteza cerebral o el cerebelo. Aun así, para comprender el papel de los astrocitos en estas áreas se necesita un análisis más exhaustivo de la relación entre la actividad astrocitaria y su función en el procesamiento de la información. La complejidad del establecimiento de una función clara y medible relacionada con la actividad sináptica en otras áreas nos llevó a investigar el papel de los astrocitos en un área en la que disponemos de menor conocimiento sobre las células de la glía, pero cuya actividad tiene unas consecuencias claras y observables, como es CeM. CeM es la principal estructura de salida de la amígdala, cuya implicación en el condicionamiento del miedo se ha estudiado y reproducido ampliamente. Por ello nuestro cuarto objetivo fue estudiar el papel de los astrocitos en la regulación la actividad neuronal de CeM, así como sobre el fenotipo comportamental derivado de la actividad de estas neuronas.

Siguiendo estos objetivos los resultados obtenidos en esta tesis doctoral permiten concluir lo siguiente:

1. Los astrocitos de CeM responden con aumentos de calcio a los eCBs movilizados de manera endógena.
2. La activación de los receptores CB1 astrocitarios genera un aumento en la probabilidad de liberación de las sinapsis inhibitoras CeL-CeM. La activación de los receptores CB1 astrocitarios genera una disminución en la probabilidad de liberación de las sinapsis excitadoras BLA-CeM. Esta modulación diferencial de las sinapsis CeL-CeM y BLA-CeM aparece en una misma neurona de CeM.
3. La activación de los receptores Gq-DREADDs en los astrocitos genera aumentos de calcio. La modulación astrociaria diferencialmente opuesta de las sinapsis de CeM observada por la activación por un estímulo endógeno puede ser reproducida mediante un estímulo selectivo exógeno (DREADDs).
4. La activación selectiva de astrocitos de CeM in vivo genera un descenso en la frecuencia de potenciales de acción en CeM. La activación selectiva de astrocitos de CeM genera una disminución en la expresión del miedo condicionado.

Dr. Alfonso Araque Almendros, Profesor de Investigación de investigación en excedencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Profesor en el Departamento de Neurociencia de la Universidad de Minnesota,

HACE CONSTAR:

Que Don Mario Martín Fernández ha realizado bajo mi dirección los trabajos de investigación destinados a la obtención del grado de Doctor en el Instituto Cajal (CSIC) y en la Universidad de Minnesota, cuyos resultados están recogidos en la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Regulación de la actividad neuronal mediada por astrocitos en la porción medial de la amígdala centra”.

Dr. Alfonso Araque

Profesor de Investigación del CSIC.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	8
1) El sistema nervioso.	11
i. Las células de glía.	12
ii. Comunicación neurona astrocito.	14
iii. Comunicación astrocito neurona.	15
2) La amígdala y el procesamiento emocional.	18
i. La amígdala basolateral (BLA): Estructura y función.	21
ii. La amígdala central (CeA): Estructura y función.	23
iii. El papel de las células de glía en la amígdala.	29
3) El sistema endocanabinoide.	31
i. Sistema endocanabinoide y las células de la glía.	33
ii. Sistema endocanabinoide en la amígdala.	34
II. OBJETIVOS.	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	41
1) Declaración ética.	43
2) Animales.	43
3) Preparación de rodajas de cerebro de ratón.	43
4) Registros electrofisiológicos en rodajas de cerebro de ratón.	44
5) Estimulación sináptica y registro de corrientes excitadoras e inhibitoras.	45
6) Monitorización de niveles de calcio astrocitarios.	46
7) Cirugías para la administración de vectores virales.	47
8) Registros electrofisiológicos in vivo.	48
9) Condicionamiento del miedo y laberinto elevado.	48
10) Drogas y reactivos.	49
11) Análisis estadístico.	50
IV. RESULTADOS.	51
1) Los astrocitos forman parte del sistema endocanabinoide.	53

i.	Comunicación neurona astrocito mediada por endocannabinoides.	54
ii.	El sistema endocanabinoide y su efecto en la transmisión sináptica mediado por astrocitos.	57
iii.	Efecto de la actividad astrocitaria sobre las corrientes GABAérgicas inhibitoras.	59
iv.	Efecto de la actividad astrocitaria sobre las corrientes glutamatérgicas excitadoras.	63
v.	Efecto de la actividad astrocitaria sobre las corrientes GABAérgicas inhibitoras y las corrientes glutamatérgicas excitadoras.	66
vi.	Efecto de la aplicación de adenosina sobre las corrientes GABAérgicas inhibitoras y glutamatérgicas excitadoras.	69
2)	Activación selectiva de astrocitos mediante quimiogenética.	73
i.	Activación de DREADDs en los astrocitos y su influencia en la señal de calcio.	74
ii.	Efecto de la activación selectiva de astrocitos en la transmisión sináptica GABAérgica procedente de CeL y en la transmisión sináptica glutamatérgica procedente de BLA.	76
iii.	Efecto de la aplicación continuada de CON sobre la señal de calcio astrocitaria.	79
iv.	Efecto de la activación persistente de los astrocitos sobre la transmisión sináptica en CeM.	81
3)	Consecuencias de la activación de los astrocitos in vivo.	85
i.	Efecto de la activación de Gq DREADDs en astrocitos sobre la frecuencia de disparo de las neuronas de CeM.	85
ii.	Estudio del efecto de la activación de Gq DREADDs en astrocitos sobre el miedo condicionado.	87
iii.	Efecto de la deficiencia en la señal de calcio astrocitaria en el condicionamiento del miedo.	90

V. DISCUSIÓN.....	93
1) Los astrocitos son parte activa del sistema endocanabinoide en la amígdala central.	95
2) Los astrocitos como elementos reguladores de la actividad sináptica y neuronal en la amígdala.	97
3) Actividad astrocitaria en CeM: Posible mecanismo homeostático regulador de la actividad neuronal. .	99
4) Regulación astrocitaria diferencial de la transmisión sináptica.	100
5) Implicación de los astrocitos en el miedo condicionado.	101
VI. CONCLUSIONES.....	105
VII. REFERENCIAS.....	109

I. INTRODUCCIÓN

1. El sistema nervioso.

El sistema nervioso se encarga del procesamiento de información proveniente tanto del medio externo como del estado interno del propio individuo, integrando esta información para generar las respuestas adecuadas, tanto para la relación con el medio externo como para el control de funciones internas. Esto es posible gracias a la interacción y comunicación de los distintos elementos que lo integran. Desde un punto de vista evolutivo, resulta obvia su relevancia en la supervivencia de los individuos y su gran importancia en los procesos de especiación, adaptándose para satisfacer las necesidades de cada especie. En el reino animal el proceso de especiación está altamente ligado a la evolución del sistema nervioso central, el cual confiere la capacidad de obtener distinta información del medio, llevar a cabo distintos tipos de procesamiento de esa información y generar respuestas diferentes.

El sistema nervioso central basa el procesamiento de la información en la actividad de las células que lo componen. Este procesamiento no sería posible sin las peculiares propiedades de estas células: capacidad tanto de generar respuestas rápidas como de experimentar modificaciones que permanezcan estables a lo largo del tiempo. Así, las neuronas son capaces de llevar a cabo estos procesos gracias a una característica trascendental: la excitabilidad eléctrica. La excitabilidad eléctrica neuronal es posible gracias a la existencia de una diferencia de voltaje y concentración de iones en el interior y el exterior de estas células, lo que genera un gradiente electroquímico que las neuronas aprovechan para el almacenamiento, procesamiento y transmisión de la información. Así, las neuronas presentan canales iónicos en sus membranas que pueden abrirse y cerrarse, permitiendo o imposibilitando el paso de iones a través de la membrana, lo que puede generar cambios en el voltaje de la membrana, es decir, cambios en la diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular. Además, las neuronas aprovechan estos cambios de voltaje presentando canales sensibles al mismo, capaces de activarse o inactivarse en distintas situaciones. Así, la comunicación de unas neuronas con otras genera potenciales graduales en las dendritas neuronales, que viajan hacia el soma donde se integra la información y se pueden activar canales voltaje dependientes en el cono axónico. En el caso de que los potenciales transitorios generados en las dendritas sean capaces de

activar estos canales se genera un proceso de apertura y cierre de canales y cambios de voltaje característico de las neuronas. Este proceso, de una importancia capital, se denomina potencial de acción. El potencial de acción es el resultado de la integración de la información compleja y gradual obtenida en las dendritas en un proceso de todo o nada: o hay potencial de acción o no lo hay. El potencial de acción transmite la información a lo largo del axón llevándola a los terminales pre sinápticos donde se produce la comunicación entre neuronas. Es en estas sinapsis, compuestas por el terminal pre sináptico y el botón post sináptico, donde una neurona va a influenciar la excitabilidad de otras neuronas, y lo hace mediante la conversión de la señal eléctrica en una señal química. Al llegar el potencial de acción al terminal pre sináptico provoca la apertura de canales de calcio, lo que estimula la fusión de vesículas a la membrana plasmática y la liberación de su contenido a la hendidura sináptica. Estas vesículas presentan en su interior unas moléculas denominada neurotransmisores, que tras ser liberados a la hendidura sináptica pueden unirse a receptores en el botón post sináptico, afectando al voltaje de la neurona receptora de la información. Entre los posibles neurotransmisores liberados están los excitadores, capaces de despolarizar la membrana de la neurona post sináptica, y los inhibidores, capaces de disminuir la actividad de la neurona post sináptica. En el sistema nervioso central el neurotransmisor excitador más común es el glutamato y el inhibidor más usual el ácido -aminobutírico (GABA).

Así, emerge la idea de que el funcionamiento del sistema nervioso central se basa únicamente en la actividad neuronal y la comunicación entre neuronas, concepción desafiada tras la irrupción de un concepto revolucionario en el campo de la neurociencia: la sinapsis tripartita (Araque, Parpura et al. 1999).

Las células de glía.

El sistema nervioso está compuesto por neuronas y células de glía. Las células de glía fueron descritas por primera vez por Virchow en 1846, quién las denominó glía al otorgarles funciones de aglutinantes del sistema nervioso. Esta visión de las células de la glía como células con

una función pasiva de soporte del sistema nervioso se convertiría en la visión tradicional que más tarde sería desafiada.

Las células de la glía forman parte de una categoría heterogénea en la que se engloban tipos celulares muy diversos y distintos entre sí. Según su origen podemos diferenciar dos tipos de células de glía, la microglía y la macroglía. La microglía, son células de origen mesenquimal con capacidad fagocítica que desempeñan las funciones de los macrófagos en el sistema nervioso central. La macroglía es otro grupo heterogéneo de células que comparten origen ectodérmico. Dentro del grupo de macroglía se incluyen los oligodendrocitos, las células de Schwann, los endotelios y la astrogía. Las células de Schwann y los oligodendrocitos generan las vainas de mielina que recubren los axones y aumentan la velocidad de propagación de los potenciales de acción en el sistema nervioso periférico y central respectivamente. Los endotelios forman una barrera en los ventrículos cerebrales y el canal endotelial de la medula espinal: la barrera hematoencefálica. La astrogía, a su vez, es otro grupo heterogéneo en el que se incluyen distintos tipos celulares presentes en diversas áreas del sistema nervioso central; así, aparecen astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris, astrocitos fibrosos en la sustancia blanca, células de Müller en la retina, glía de Bergman en el cerebelo y astrocitos perivasculares recubriendo los vasos sanguíneos. Además de una función de soporte y aglutinante, de manera tradicional a los astrocitos se les han atribuido funciones en el desarrollo de las sinapsis, la recaptación de neurotransmisores, la provisión de precursores de neurotransmisores, el mantenimiento de concentraciones iónicas extracelulares y el soporte trófico, entre otras (Walz 1989, Hatten and Mason 1990, Vernadakis 1996, Ullian, Saperstein et al. 2001, Barres 2008).

Además de esta función de soporte y homeostática, cada vez un mayor número de evidencias sitúan a los astrocitos como elementos activos y clave en la regulación de la actividad sináptica y neuronal. En el centro de esta función activa aparece el concepto de sinapsis tripartita (Araque, Parpura et al. 1999), en el que la sinapsis no está compuesta únicamente por dos partes (terminal pre sináptica y botón post sináptica), sino que aparece un tercer componente, el astrocito. Los astrocitos extienden sus ramificaciones, denominadas procesos, hasta

establecer estrechos contactos con los componentes neuronales de las sinapsis, de forma que, gracias a receptores de neurotransmisores presentes en su membrana, pueden percibir la liberación de neurotransmisores, y además pueden afectar a la actividad neuronal y sináptica gracias a la liberación de moléculas neuroactivas denominadas gliotransmisores (Araque, Parpura et al. 1999, Araque, Carmignoto et al. 2014, Volterra, Liaudet et al. 2014).

De esta forma los astrocitos interactúan con los elementos sinápticos de manera bidireccional: son parte funcional de la sinapsis y modulan su actividad, tanto a corto como a largo plazo. Esta capacidad de comunicación bidireccional entre los astrocitos y los componentes neuronales de la sinapsis es la base del concepto de la sinapsis tripartita, una revisión del concepto clásico de sinapsis en el que únicamente se tenían en cuenta sus componentes neuronales.

Comunicación neurona-astrocito.

Al no ser excitables eléctricamente, la actividad de los astrocitos pasó desapercibida durante gran parte de la historia de la neurociencia, cuando la excitabilidad eléctrica era la única medida de la actividad del sistema nervioso. No fue hasta la década de los 90 cuando la revolución en técnicas de imagen y fluorescencia permitió la monitorización de los niveles intracelulares de calcio, revelando la compleja y heterogénea actividad astrocitaria (Cornell-Bell, Finkbeiner et al. 1990, Charles, Merrill et al. 1991).

Los astrocitos, gracias a la expresión de receptores funcionales de neurotransmisores en sus membranas, son capaces de responder a la actividad neuronal con aumentos de calcio (Araque, Carmignoto et al. 2014, Volterra, Liaudet et al. 2014). Cuando las neuronas liberan neurotransmisores, estos activan sus correspondientes receptores en las membranas de los astrocitos, lo que produce aumentos del calcio intracelular. La principal fuente de calcio es el retículo endoplasmático, que funciona como reservorio de calcio que puede liberarse gracias a canales activados por ligando. Estos son los receptores de IP_3 tipo 2 (IP_3R2), activados por IP_3 , y los receptores de rianodina (RyR), activados por calcio. La activación de los receptores metabotrópicos en la membrana plasmática genera principalmente la producción de IP_3 y

la activación de los receptores IP_3R2 , elevando los niveles intracelulares de calcio. Este incremento en los niveles de calcio se ha relacionado con la activación en los astrocitos del complejo SNAP-SNARE, lo que produce la fusión de vesículas a la membrana y la liberación de gliotransmisores. De esta forma la actividad neuronal aumenta los niveles de calcio en los astrocitos que liberan gliotransmisores modulando a su vez la actividad sináptica y neuronal (Araque, Parpura et al. 1999, Holtzclaw, Pandhit et al. 2002, Fiacco and McCarthy 2004, Zorec, Araque et al. 2012, Araque, Carmignoto et al. 2014)

La señal de calcio en los astrocitos puede ocurrir en distintos compartimentos. Tradicionalmente se ha estudiado en el soma del astrocito, por lo que se ha relacionado extensamente con la gliotransmisión y sus efectos en las neuronas (Kang, Jiang et al. 1998, Araque, Martin et al. 2002, Navarrete and Araque 2008, Gomez-Gonzalo, Losi et al. 2010, Perez-Alvarez, Navarrete et al. 2014, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015, Martin, Bajo-Graneras et al. 2015). Recientemente, se ha puesto de manifiesto la existencia de señales de calcio restringidas a distintos compartimentos o microdominios (Grosche, Matyash et al. 1999, Perea and Araque 2005, Di Castro, Chuquet et al. 2011, Panatier, Vallee et al. 2011); estos eventos de calcio se denominan eventos locales, son evocados por actividad neuronal espontánea y podrían llegar a expandirse a otros compartimentos celulares e incluso al soma cuando son evocados por actividad neuronal dependiente de potenciales de acción. La señal de calcio astrocitaria es una señal compleja dependiente de los estímulos que la provocan, que puede localizarse en distintos microdominios y extenderse a otros, dando la posibilidad de generar distintas respuestas según los estímulos que la provoquen (Araque, Carmignoto et al. 2014, Volterra, Liaudet et al. 2014). Además de esta organización intracelular, la señal de calcio también se encuentra organizada a nivel intercelular. Así, en el núcleo estriado aparecen distintas poblaciones de astrocitos que son capaces de responder de manera preferencial a estímulos procedentes de distintas poblaciones neuronales (Martin, Bajo-Graneras et al. 2015).

Comunicación astrocito-neurona.

Las neuronas liberan neurotransmisores que activan receptores en la membrana plasmática de los astrocitos. Por su parte, los astrocitos

liberan gliotransmisores que activan receptores en la membrana plasmática de las neuronas. Mediante estos gliotransmisores los astrocitos regulan la actividad sináptica y neuronal tanto a corto como a largo plazo. Podemos definir los gliotransmisores como moléculas sintetizadas o almacenadas en el interior de las células gliales, liberadas como respuesta a estímulos fisiológicos, que inducen una respuesta rápida en la actividad sináptica y que desempeñan un papel relevante en procesos fisiológicos (Volterra and Meldolesi 2005).

Si bien es cierto que la gliotransmisión aún genera cierta controversia (Agulhon, Fiacco et al. 2010, Nedergaard and Verkhratsky 2012, Sloan and Barres 2014), un número cada vez mayor de evidencias avalan su relevancia funcional en el procesamiento de información en el sistema nervioso. Se ha demostrado que la liberación de gliotransmisores afecta a la actividad neuronal en numerosas áreas cerebrales como el hipocampo (Kang, Jiang et al. 1998, Perea and Araque 2007, Panatier, Vallee et al. 2011, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015), la corteza cerebral (Min and Nevian 2012, Perea, Yang et al. 2014, Mariotti, Losi et al. 2016) y el núcleo estriado (Martin, Bajo-Graneras et al. 2015). Además, en respuesta a distintos estímulos, los astrocitos pueden liberar distintos neurotransmisores como glutamato (Navarrete and Araque 2010), ATP (Serrano, Haddjeri et al. 2006) o D-serina (Henneberger, Papouin et al. 2010). La liberación de estos gliotransmisores en algunos casos se relaciona con modulaciones tónicas de la actividad neuronal (Henneberger, Papouin et al. 2010, Panatier, Vallee et al. 2011), en otros con modulaciones a corto plazo de la actividad sináptica (Navarrete and Araque 2010, Martin, Bajo-Graneras et al. 2015) y en otros con efectos a largo plazo (Perea and Araque 2007, Henneberger, Papouin et al. 2010, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015).

Los astrocitos abarcan territorios diferenciados y no coincidentes, pudiendo un solo astrocito estar en contacto con miles de sinapsis (Ventura and Harris 1999, Bushong, Martone et al. 2002). Además, la señal de calcio puede propagarse de manera intra e intercelular (Giaume and McCarthy 1996, Grosche, Matyash et al. 1999, Giaume, Koulakoff et al. 2010, Araque, Carmignoto et al. 2014). De estas propiedades deriva una importante característica de la modulación de la actividad sináptica mediada por astrocitos: la llamada regulación

lateral (Covelo and Araque 2016). Cuando una sinapsis activa genera aumentos de calcio en un astrocito, estos aumentos pueden propagarse por el soma y los procesos del astrocito e incluso inducir aumentos de calcio en otros astrocitos, liberándose gliotransmisores en sinapsis alejadas de las sinapsis originadoras de la señal de calcio. Esto permite a los astrocitos servir como puente de información entre neuronas cercanas que de otra forma no estarían comunicadas. Un importante ejemplo aparece en el núcleo estriado, donde aparecen dos poblaciones neuronales y los astrocitos comunican entre sí a las neuronas de cada población, permitiendo que la actividad en una neurona aumente la transmisión sináptica en neuronas de su misma población, pero no en las neuronas de la otra población (Martin, Bajo-Graneras et al. 2015).

2. La amígdala y el procesamiento emocional.

La amígdala es una estructura crucial en el procesamiento de estímulos con valencia emocional, tanto positiva como negativa. Su papel se ha estudiado principalmente en el procesamiento de estímulos que generan una respuesta defensiva. Así, se ha investigado con gran profundidad su implicación en procesos que generan un estado de miedo y de ansiedad (LeDoux 2000). El miedo puede definirse como la respuesta anticipada a una amenaza o estímulo nocivo concreto y predecible, mientras que la ansiedad se diferencia del miedo en que la amenaza o estímulo nocivo no es un estímulo concreto y su aparición no puede ser predicha con exactitud temporal ni espacial. Obviamente, si bien la clasificación de reacciones de miedo y ansiedad en dos categorías distintas es una simplificación, esta ha permitido la identificación de diferentes estructuras y rutas de procesamiento de información (Davis 1992, Davis 1998, Tovote, Fadok et al. 2015).

Los trastornos en el procesamiento del miedo y la ansiedad (síndrome de estrés post-traumático, fobias sociales, trastornos de ansiedad generalizada, etc.) son el problema psiquiátrico más común, apareciendo en un 20% de la población según la *Anxiety and Depression Association of America* (ADAA). Este porcentaje es más del doble del porcentaje de personas que sufren trastornos relacionados con el estado de ánimo (como la depresión y el trastorno bipolar) y veinte veces más del porcentaje de personas que sufren de esquizofrenia. La ADAA además estima el coste causado por los trastornos del miedo y la ansiedad en 40 mil millones de dólares anuales. Además este 20% podría estar subestimando el impacto social real de los trastornos asociados al procesamiento del miedo y la ansiedad pues estos también pueden estar involucrados en otras condiciones psiquiátricas como la depresión, trastornos en la alimentación, adicción o esquizofrenia. Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en el procesamiento del miedo y la ansiedad, así como de las alteraciones en estos mecanismos que generan un procesamiento patológico.

El miedo es una de las emociones estudiadas con más detalle, en parte por la gran evolución y reproducibilidad de los métodos conductuales utilizados para su estudio. Es importante recalcar que cuando se utiliza

la palabra miedo se está haciendo referencia a aquellos comportamientos conductuales cuantificables asociados con respuestas de defensa frente a estímulos potencialmente nocivos o perjudiciales para el organismo. En ningún caso se tiene que confundir esta acepción del miedo con la utilizada en ámbitos coloquiales, entendiéndose el miedo como la sensación consciente experimentada por los seres humanos ante la presentación de una amenaza o un peligro. Este matiz es importante pues en estudios con seres humanos se ha demostrado que la sensación consciente de miedo no es necesaria para evocar respuestas fisiológicas asociadas con mecanismos de defensa, por lo que estas respuestas no son un reflejo de esas sensaciones conscientes, que pueden estar o no estar ocurriendo en los individuos sometidos a la experimentación, pero que no son el objeto de estudio (LeDoux 2014). Las manifestaciones conductuales generalmente asociadas como respuesta al miedo son las de huida, defensa o parálisis. Dentro de estas la estudiada de manera más extensa es la respuesta de parálisis o *freezing*. El *freezing* es una respuesta al miedo largamente conservada, apareciendo especies que muestran una mayor preferencia innata por el *freezing* que otras. La expresión de una determinada respuesta al miedo está determinada tanto por el estímulo aversivo, como por el ambiente (por ejemplo la aparición o no de vías de escape para la huida) o como por el propio estado interno del individuo (por ejemplo altos niveles de ansiedad se relacionan con una mayor tendencia a respuestas de *freezing*) (Maren 2001, Roelofs, Hagenaars et al. 2010, Blanchard, Griebel et al. 2011, Roelofs 2017).

En el estudio del miedo se pueden separar dos tipos de miedo, el innato o no condicionado y el aprendido o condicionado. El miedo innato o no condicionado se expresa por estímulos que desencadenan comportamientos relacionados con el miedo sin necesidad de estar asociados con ningún otro estímulo, por ejemplo los estímulos dolorosos (que generan por si mismos una respuesta conductual) o diversos estímulos dependientes de la especie animal como los olores de sus predadores o los espacios abiertos y luminosos que generan miedo no condicionado en roedores; en cambio en primates podríamos destacar la observación de serpientes y arañas o de caras con expresiones agresivas de miembros de la misma especie (LeDoux 2012). En el caso del miedo condicionado o aprendido, estímulos

originalmente inocuos adquieren la condición de amenazantes al haber ocurrido con anterioridad junto a estímulos nocivos o amenazantes (LeDoux 2012). Como ejemplos de miedo condicionado podríamos señalar la relación de un determinado sonido con la aparición de un predador o la de una localización concreta con una experiencia aversiva previa.

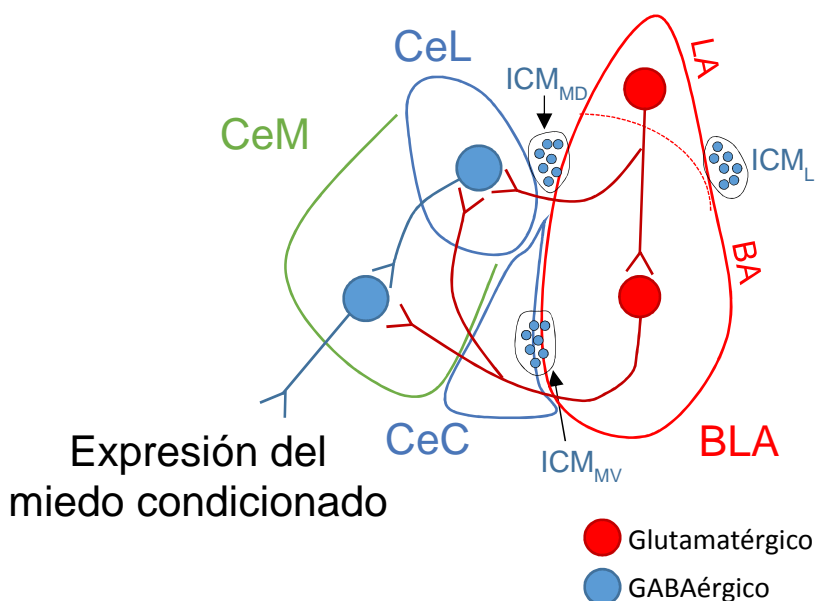


Figura 1: La amígdala y sus principales subnúcleos. Representación esquemática de la amígdala y sus principales subnúcleos. Se representan las neuronas de la porción medial de la amígdala central (CeM; verde) además de las neuronas de la porción lateral de la amígdala central (CeL; azul) y de la amígdala basolateral (BLA; rojo). También se representa en azul la amígdala capsular central (CeC), que algunos autores consideran parte de CeL. También aparecen representadas las masa de células intercaladas (ICMs), pequeñas poblaciones de las neuronas GABAérgicas que aparecen en la capsula externa (ICM_L) y en la capsula intermedia (ICM_{MD} y ICM_{MV}). En rojo se representan las neuronas glutamatergicas y en azul las neuronas GABAérgicas.

La amígdala basolateral (BLA): estructura y función.

La amígdala basolateral (BLA) está compuesta principalmente por neuronas glutamatérgicas de proyección (un 80% aproximadamente) y una minoría de interneuronas GABAérgicas (un 20% aproximadamente). Este área se puede dividir en la amígdala basal (BA) y la amígdala lateral (LA) y se considera la principal estructura de entrada de información de la amígdala, recibiendo información sensorial desde el tálamo (LeDoux, Farb et al. 1990) y la corteza cerebral (McDonald 1998). En concreto, LA se considera el núcleo más importante en la entrada de información, siendo crítico para la asociación de los estímulos condicionados y no condicionados procedentes de la corteza cerebral y del tálamo. Así, esta convergencia de información del estímulo condicionado y del no condicionado produciría una potenciación de las sinapsis encargadas de transmitir el estímulo condicionado, con lo que, de volver a presentarse, este estímulo sería capaz de activar las neuronas de LA y activar a sus dianas (CeA; Figura 2), generando respuestas de miedo (Quirk, Repa et al. 1995, Rogan, Staubli et al. 1997).

El papel de la plasticidad en LA en el condicionamiento del miedo se ha demostrado al poner de manifiesto la necesidad de plasticidad sináptica dependiente de receptores NMDA en LA para la adquisición del miedo condicionado (Gewirtz and Davis 1997). Además, mediante técnicas optogenéticas se ha conseguido demostrar el papel de la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long term potentiation*) y la depresión a largo plazo (LTD, del inglés *long term depression*) en BLA en los procesos de condicionamiento del miedo. Así, se puede generar un condicionamiento del miedo en el que el estímulo condicionado (normalmente un tono de una determinada frecuencia) sea sustituido por la activación optogenética del córtex auditivo (Nabavi, Fox et al. 2014). La activación de estas sinapsis provenientes del córtex auditivo a BLA con un protocolo de estimulación que genera mecanismos sinápticos de LTD produce una inactivación de la memoria del miedo, mientras que la utilización de un protocolo de estimulación que genera mecanismos sinápticos de LTP reactiva la memoria del miedo previamente inactivada (Nabavi, Fox et al. 2014). Otro estudio basado en la utilización de técnicas optogenéticas ha demostrado que, si bien la generación de procesos de plasticidad de sinapsis en BLA es

necesaria para la generación de memorias aversivas, éstas no son suficientes, pues se necesita la co-activación de sistemas neuromoduladores (Johansen, Diaz-Mataix et al. 2014).

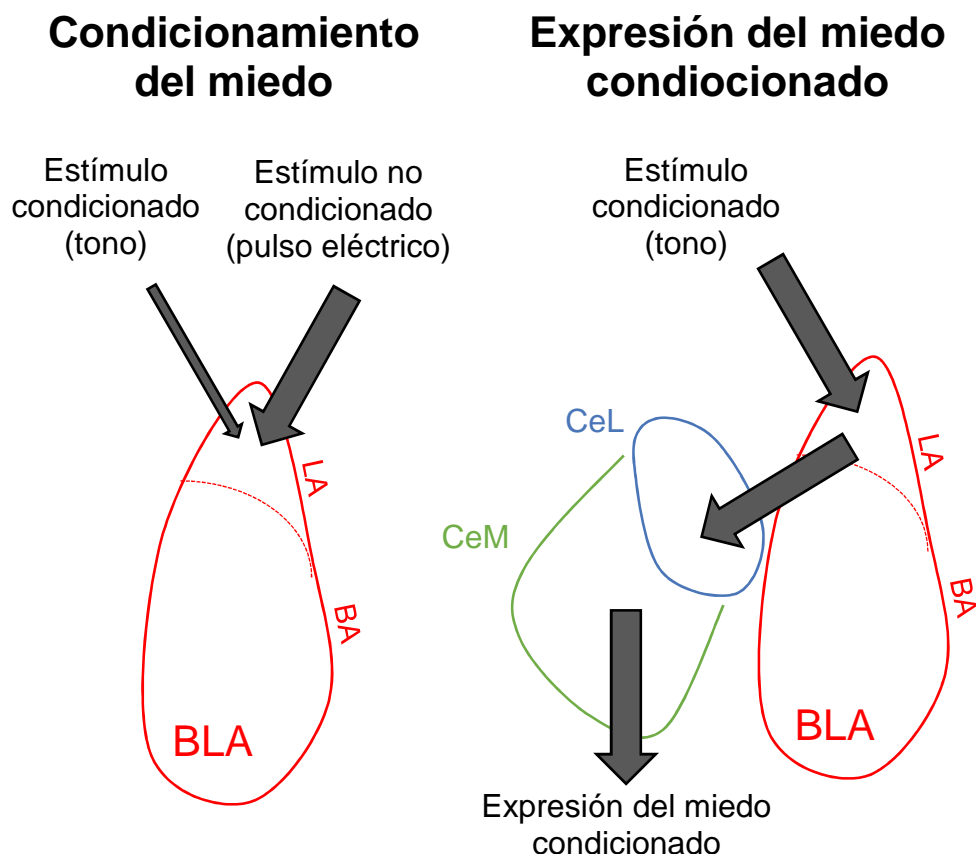


Figura 2: Esquema simplificado de la conectividad que provoca la adquisición y expresión del miedo condicionado. *Izquierda: Representación esquemática del proceso de aprendizaje ocurrido durante el condicionamiento del miedo. El estímulo condicionado (con una capacidad débil de originar actividad en LA) coincide con el estímulo no condicionado en LA (con una mayor capacidad de generar actividad en LA), lo que genera plasticidad sináptica en las sinapsis que portan la información del estímulo condicionado. Derecha: Tras el proceso de plasticidad generado durante el proceso de condicionamiento observado en el esquema de la izquierda, el estímulo condicionado por si solo tiene una mayor capacidad de generar actividad en LA, tras lo que activa a la amígdala central y provoca la expresión del miedo condicionado.*

La plasticidad sináptica en BLA no solo media la adquisición de memorias con valencia emocional negativa (Rogan, Staubli et al. 1997), sino que también es importante para la adquisición de memorias con valencia positiva (Tye, Stuber et al. 2008). Como responsables de la adquisición de las memorias con valencia positiva y negativa se han propuesto dos poblaciones diferenciadas de neuronas excitadoras en BLA (Namburi, Beyeler et al. 2015). La adquisición de memorias con valencia positiva se relaciona con neuronas excitadoras de BLA que proyectan al núcleo accumbens (NAc) y la adquisición de memorias de valencia negativa se relaciona con neuronas excitadoras de BLA que proyectan a la porción medial de la amígdala central (CeM). Así, las neuronas excitadoras de BLA que proyectan sus axones al NAc están relacionadas con la adquisición de memorias de refuerzo positivo (su relación AMPA/NMDA aumenta después del aprendizaje de refuerzo positivo y disminuye tras el aprendizaje de refuerzo negativo, y su estimulación con técnicas optogenéticas genera refuerzo positivo). Por otro lado, las neuronas excitadoras de BLA que proyectan sus axones al CeM están relacionadas con la adquisición de memorias de refuerzo negativo (su relación AMPA/NMDA aumenta después del aprendizaje de refuerzo negativo y disminuye tras el aprendizaje de refuerzo positivo; su inhibición con técnicas optogenéticas perjudica la adquisición de aprendizajes de refuerzo negativo, favoreciendo el refuerzo positivo, y su estimulación con técnicas optogenéticas genera refuerzo negativo) (Namburi, Beyeler et al. 2015). Así, aunque principalmente se hayan estudiado sus conexiones con la amígdala central (CeA), BLA también es una importante estructura de salida proyectando a estructuras como el NAc, el núcleo estriado, la corteza cerebral o el tálamo (Duvarci and Pare 2014).

La amígdala central (CeA): estructura y función.

La amígdala central (CeA) contiene neuronas GABAérgicas de proyección, similares a las neuronas de espinas medianas (MSNs, del inglés *medium spiny neurons*) del núcleo estriado (McDonald 1982). Estas pueden dividirse en tres tipos según sus propiedades electrofisiológicas: neuronas de disparo regular (RS, del inglés *Regular Spiking*), neuronas de brotes de bajo umbral (LTB, del inglés *Low threshold bursting*) y neuronas de disparo tardío (LF del inglés *Late*

firing) (Martina, Royer et al. 1999, Dumont, Martina et al. 2002, Lopez de Armentia and Sah 2004, Haubensak, Kunwar et al. 2010).

CeA se divide principalmente en su porción lateral (CeL) y su porción medial (CeM). CeL inhibe a CeM que es la principal estructura de salida, de modo que la activación de CeL y CeM tendría efectos antagónicos; un claro ejemplo es la activación diferencial de estas áreas a través de neuromoduladores. Las neuronas de CeL y CeM expresan distintos receptores de neuropéptidos; así, las neuronas de CeL expresan receptores de oxitocina y las neuronas de CeM receptores de vasopresina (Huber, Veinante et al. 2005). La oxitocina produce efectos ansiolíticos y disminución de estrés; promueve relaciones sociales, cuidados maternos y extinción del condicionamiento de evasión, mientras que la vasopresina aumenta la agresividad, la ansiedad y el estrés además de favorecer la consolidación de memorias relacionadas con el condicionamiento del miedo, y su efecto diferencial se relaciona con la activación diferencial de las neuronas de CeL y CeM respectivamente (Huber, Veinante et al. 2005). Así la vasopresina aumenta la actividad de las neuronas de CeM, mientras que la oxitocina aumenta la frecuencia de corrientes post sinápticas inhibitoras (IPSCs, del inglés *inhibitory post synaptic currents*) en las neuronas de CeM, de forma que la vasopresina aumenta la actividad en CeM y la oxitocina la disminuye. (Huber, Veinante et al. 2005, Viviani, Charlet et al. 2011).

CeA recibe importante información de BLA; así, la activación con técnicas optogenéticas de las células glutamatérgica excitadoras de BLA produce corrientes post sinápticas excitadoras (EPSCs, del inglés *excitatory post synaptic currents*), y la activación de las células GABAérgicas de CeL, produce IPSCs en las neuronas GABAérgicas de CeM. Pero la activación de las neuronas glutamatérgicas de BLA a su vez produce la activación directa de las neuronas de CeM. (Tye, Prakash et al. 2011). Además, la activación de las proyecciones GABAérgicas de BLA a CeL produce efectos ansiolíticos, y su inhibición efectos ansiogénicos (Tye, Prakash et al. 2011). De esta forma, BLA transmite información a CeA, que se considera la principal estructura de salida de la amígdala proyectando áreas encargadas de producir comportamientos asociados con el miedo y la ansiedad. Para ello, CeM proyecta a áreas como el núcleo periacueductual gris (PAG) (LeDoux, Iwata et al. 1988), el núcleo parabraquial, el locus coeruleus

(Cedarbaum and Aghajanian 1978), el núcleo solitario y el complejo vagal dorsal (Duvarci and Pare 2014), el hipotálamo lateral, (Krettek and Price 1978, LeDoux, Iwata et al. 1988), el hipotálamo paraventricular (Gray, Carney et al. 1989) y el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (Dong, Petrovich et al. 2001). Así, su actividad se ha relacionado no solo con el miedo condicionado (LeDoux, Iwata et al. 1988) y la ansiedad (Tye, Prakash et al. 2011, Cai, Haubensak et al. 2014, Gilpin, Herman et al. 2015, Tovote, Fadok et al. 2015), sino también con otros fenotipos como la evaluación del riesgo durante la exploración (Gozzi, Jain et al. 2010) o la alimentación (Cai, Haubensak et al. 2014).

Dentro de CeA, su porción medial (CeM) es considerada la principal estructura de salida, especialmente en el caso del miedo condicionado, proyectando sus axones a áreas del tronco encefálico encargadas de producir las respuestas asociadas a los estímulos aversivos, entre las que cabe destacar el núcleo periacueductual gris (PAG), encargado del comportamiento de *freezing*. Así, las neuronas de CeA aumentan el *freezing* a través del circuito amígdala-mesencéfalo-bulbo raquídeo. De forma que la actividad de las neuronas inhibitorias de salida de CeM producen un aumento del *freezing* al inhibir interneuronas del núcleo periacueductual gris ventrolateral (vIPAG), quedando desinhibidas las neuronas excitadoras de salida del vIPAG, con lo que activan a sus dianas premotoras en el núcleo magnocelular del bulbo raquídeo (Tovote, Esposito et al. 2016). Es interesante recalcar que aparecen distintas poblaciones de células excitadoras de salida en vIPAG, unas que se correlacionan positivamente con el *freezing* y otras con relaciones negativas, lo que sugiere que estas distintas poblaciones podrían estar mediando distintas respuestas al miedo como las respuestas de *freezing* o las de huida. (Tovote, Esposito et al. 2016).

Así, la actividad en CeM es necesaria para la expresión del miedo condicionado, aumentando su actividad tras la presencia del estímulo condicionado y provocando la expresión de los comportamientos de miedo asociados a estímulos aversivos. En cambio, la actividad de las neuronas GABAérgicas de CeL es necesaria para la adquisición del condicionamiento del miedo (Ciocchi, Herry et al. 2010). Las neuronas GABAérgicas de CeL inhiben de manera tónica a CeM, de forma que si disminuye la actividad en CeL se genera una desinhibición de CeM,

produciendo *freezing* (Ciocchi, Herry et al. 2010). Dentro de las neuronas GABAérgicas de CeL aparecen neuronas cuya actividad aumenta tras la presentación de estímulos condicionados (CS), denominadas CS_{on}, y otras cuya actividad disminuye tras presentar estímulos condicionados, denominadas CS_{off} (Ciocchi, Herry et al. 2010). Además, las neuronas GABAérgicas de CeL pueden clasificarse según la expresión de la proteína quinasa C- (PKC-), así aparecen neuronas PKC- ⁺ y PKC- ⁻. Aproximadamente el 50% de las neuronas de CeL son PKC- ⁺ y son predominantemente células CS_{off}. Las neuronas PKC- ⁺ inhiben directamente a las neuronas de salida de CeM e inhiben a las neuronas PKC- ⁻ dentro de CeL. Las neuronas PKC- ⁻ (predominantemente CS_{on}) inhiben a su vez a las neuronas de PKC- ⁺ (Haubensak, Kunwar et al. 2010). Así, tras el condicionamiento del miedo, cuando se presenta el estímulo condicionado las células CS_{on}, o PKC- ⁻, se activan, inhibiendo a las neuronas CS_{off}, o PKC- ⁺, disminuyendo la inhibición que estas producían sobre las neuronas de salida de CeM, permitiendo que estas generen la expresión del *freezing* (Figura 3) (Ciocchi, Herry et al. 2010, Haubensak, Kunwar et al. 2010).

Además, CeA no es una estación pasiva de intercambio de información como se consideró de manera tradicional, pues el condicionamiento del miedo produce también plasticidad en las sinapsis excitadoras sobre las neuronas de CeL; siendo esta potenciación necesaria para la obtención del condicionamiento del miedo (Li, Penzo et al. 2013), y la activación de estas sinapsis necesaria y suficiente para la expresión del comportamiento de miedo condicionado (Li, Penzo et al. 2013). Este aumento de la transmisión sináptica excitadora sobre las neuronas de CeL tras el condicionamiento del miedo se produce únicamente en las neuronas de CeL distinguidas por el marcador neuroquímico somatostatina (SOM). Las neuronas de CeL se pueden clasificar así como SOM⁺ o SOM⁻. La poblaciones de neuronas SOM⁻ coincide parcialmente con la población PKC- ⁺. Las neuronas SOM⁺ pueden entonces considerarse como CS_{on} o PKC- ⁻. Así, tras el condicionamiento del miedo, aumenta la excitación glutamatérgica sobre las SOM⁺, estas no proyectan a las neuronas de salida de CeM

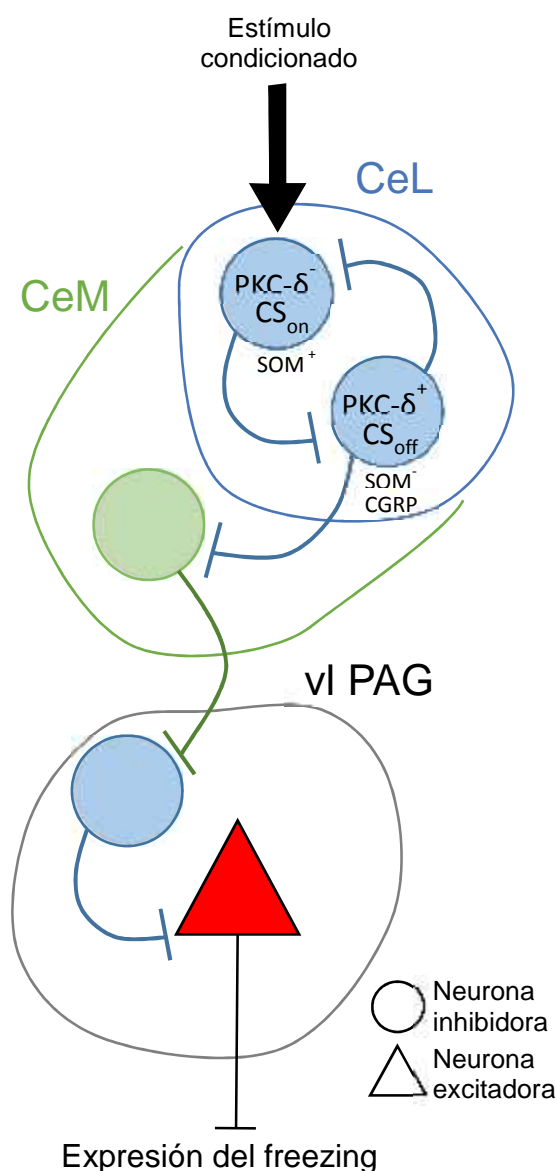


Figura 3: Esquema de la conectividad de la amígdala central.

Esquema de la amígdala central en el que se distinguen la porción lateral (CeL, azul) y la porción medial (CeM, verde). Además aparece esquematizada uno de los principales núcleos diana de CeM, la porción ventrolateral del núcleo periacueductual gris (vl PAG). Tras el condicionamiento del miedo el estímulo condicionado es capaz de aumentar la actividad de las neuronas CS_{on}, estas inhiben a las neuronas CS_{off}, con lo que las neuronas de CeM quedan desinhibidas, aumentando su actividad e inhibiendo a las interneuronas de vl PAG, con lo que disminuye la inhibición de las neuronas excitadoras glutamatérgicas de vl PAG que pueden activar a sus dianas premotoras.

pero inhiben a las neuronas SOM⁻, con lo que aumentaría la inhibición sobre estas neuronas SOM⁻, CS_{off} o PKC-⁺ (Ciocchi, Herry et al. 2010, Haubensak, Kunwar et al. 2010, Li, Penzo et al. 2013). Además, se produce una disminución la excitación glutamatérgica sobre las SOM⁻ (Li, Penzo et al. 2013), con lo que tras el condicionamiento del miedo, la actividad de las neuronas SOM⁻, CS_{off} o PKC-⁺ estaría disminuida, desinhibiendo a las neuronas de salida de CeM y permitiendo la expresión del comportamiento de miedo (Li, Penzo et al. 2013).

Otro caso de regulación activa en CeA es el aumento de inhibición en las neuronas de salida de la CeA relacionado con la extinción del miedo (Amano, Unal et al. 2010). Este aumento de la inhibición se produce por un aumento de la actividad de las sinapsis excitadoras sobre las ICMS (GABAérgicas), con lo que aumenta la inhibición sobre las neuronas de salida de la CeA (Amano, Unal et al. 2010).

No solo la entrada de información a CeA desde BLA es importante para la adquisición del miedo condicionado. La activación por los estímulos condicionados sensoriales (sinapsis excitadoras procedentes de BLA) junto a los estímulos no-condicionados procedentes de la activación de señales de dolor (sinapsis excitadoras procedentes de neuronas que expresan el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, CGRP, del núcleo parabraquial) es necesaria para el condicionamiento del miedo, siendo necesario su efecto sobre las neuronas de CeL que expresan el receptor de CGRP (cuya expresión coincide con la expresión del marcador PKC-) (Han, Soleiman et al. 2015). También, el núcleo del tálamo paraventricular (PVT: un área activada por estímulos tanto físicos como psicológicos que generan estrés) controla el procesamiento del miedo en CeL regulando la actividad de las neuronas SOM⁺ de CeL, a través de la liberación de *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), siendo necesaria la actividad de las neuronas de PVT para la adquisición de memorias de miedo y su posterior expresión. Así, PVT es un nodo de integración de la detección de estrés y la expresión de respuestas de miedo (Penzo, Robert et al. 2015).

Otras entradas a CeA también son importantes en el procesamiento de otros estímulos, así, las neuronas PKC- ⁺ de CeL también se activan por estímulos anorexigénicos, y su activación es necesaria para la acción de esos estímulos anorexigénicos (Cai, Haubensak et al. 2014). De manera consistente, la activación de las neuronas PKC- ⁺ de CeL inhibe la alimentación, además de producir efectos ansiolíticos (Cai, Haubensak et al. 2014). También se puede producir un escenario de ansiedad generalizada tras un proceso de condicionamiento de miedo que es dependiente de la actividad de las neuronas PKC- ⁺, producida por un aumento de la inhibición extrasináptica que regula la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las neuronas PKC- ⁺ (Botta, Demmou et al. 2015).

Por lo tanto, podemos afirmar que CeL recibe múltiples entradas de información, tanto desde BLA (portando información sobre estímulos condicionados), como desde tronco encefálico, tálamo y corteza, con información multimodal que varía desde el dolor, al estrés o al estado del animal. Así, CeL funciona como un importante nodo de procesamiento de información, capaz de integrar esta información multimodal con valencia emocional y transmitírsela a CeM.

CeM recibe por lo tanto importante información procedente tanto de CeL como de BLA, integrándola y produciendo las respuestas adecuadas a los estímulos. Así, la actividad de CeM estará sometida a un continuo balance entre la excitación procedente de BLA y la inhibición procedente de CeL, cuyas variaciones generarán aumentos o disminuciones en la frecuencia de disparo de potenciales de acción de las neuronas de CeM, lo que determinará la expresión de comportamientos asociados al miedo.

El papel de las células de glía en la amígdala.

El papel de las células de glía en la amígdala permanece relativamente desconocido. La gran mayoría de estudios realizados sobre la fisiología de la amígdala y su implicación en el procesamiento de información con relevancia emocional se han centrado en el papel de la actividad neuronal y sináptica. Las alteraciones en esta actividad neuronal y sináptica tras protocolos de condicionamiento del miedo han sido extensamente estudiadas. Así, el condicionamiento del miedo induce tanto plasticidad sináptica como cambios morfológicos en las sinapsis de LA (Kasai, Fukuda et al. 2010). En relación con esto, recientemente se ha demostrado que el porcentaje de sinapsis en LA rodeadas por procesos astrocitarios disminuye de manera transitoria tras el condicionamiento del miedo (Ostroff, Manzur et al. 2014). Además el bloqueo de la transferencia de lactato de astrocitos a neuronas en BLA reduce la respuestas condicionadas a la cocaína (Boury-Jamot, Carrard et al. 2016). Estos resultados sugieren un posible papel de los astrocitos de BLA en la adquisición de memorias con valencia emocional.

En la amígdala central el papel de los astrocitos no se ha estudiado con exhaustividad, si bien destaca un estudio que demuestra que el bloqueo del transportador de glutamato GLT-1 mediante la micro inyección de

ácido dihidrokaínico (DHK) induce la expresión de comportamientos relacionados con la ansiedad y la depresión, además de aumentar la respuesta de miedo al estímulo (John, Sypek et al. 2015). Estos resultados sugieren pues que las alteraciones en la recaptación de glutamato por los astrocitos pueden influir en fenómenos de depresión o ansiedad.

3. El sistema endocanabinoide

Desde hace siglos se han utilizado las cualidades psicoactivas del (-)-trans-⁹-tetrahidrocanabinol (THC), principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis Sativa*, en la que también aparecen otros compuestos denominados cannabinoides. El descubrimiento de receptores de cannabinoides (los receptores CB1 y CB2), y de sus ligandos endógenos (anandamida y 2-araquidonoilglicerol) permitió un mejor entendimiento del sistema endocanabinoide y sus funciones fisiológicas, situándolo como un importante regulador de la actividad sináptica (Devane, Hanus et al. 1992, Howlett, Barth et al. 2002). Es precisamente mediante estas modulaciones de la actividad sináptica y neuronal que el sistema endocanabinoide interviene en funciones neurales tales como el funcionamiento cognitivo, la alimentación, el control motor y el dolor; además, anomalías en su señalización se han relacionado con la ansiedad y la depresión (Castillo, Younts et al. 2012).

En el sistema nervioso central, las propias neuronas son capaces de liberar agonistas de receptores de cannabinoides, denominados endocannabinoides. Estos endocannabinoides son de naturaleza lipofílica y provienen de la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana plasmática (Piomelli 2003). A diferencia de los neurotransmisores clásicos, los endocannabinoides no se almacenan en vesículas y su síntesis se produce a demanda por el estímulo que provoca su liberación. Así, cuando la membranas post sinápticos se despolarizan se pueden activar canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC), aumentando los niveles de calcio. El calcio es necesario para la activación de las enzimas responsable de la síntesis de los endocannabinoides. Una vez sintetizados, los endocannabinoides atraviesan la hendidura sináptica para unirse a sus receptores en la membrana pre sináptica tras lo cual son recaptados y degradados en el interior de la célula (Piomelli 2003, Castillo, Younts et al. 2012).

Los receptores de cannabinoides CB1 y CB2 son receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G (Matsuda, Lolait et al. 1990, Shen, Piser et al. 1996, Szabo, Muller et al. 1999, Hua, Vemuri et al. 2016). De estos receptores el más importante en el sistema nervioso central es el receptor CB1, que aparece predominantemente en los terminales pre sinápticos neuronales asociado a proteínas Gi/o

(Shen, Piser et al. 1996, Szabo, Muller et al. 1999, Wilson and Nicoll 2001, Castillo, Younts et al. 2012).

Así, los endocannabinoides son mensajeros retrógrados, que se sintetizan en el terminal post sináptico y ejercen su función en receptores en el terminal pre sináptico (una señalización de sentido opuesto a la ejercida por los neurotransmisores clásicos). En el terminal pre sináptico la activación de los receptores CB1 produce una disminución de la entrada de calcio dependiente de canales de calcio voltaje dependientes (VGCC), lo que produce una disminución en la liberación de neurotransmisores desde dicho terminal (Kreitzer and Regehr 2001, Wilson and Nicoll 2001, Brown, Brenowitz et al. 2003). Así, la actividad sináptica puede inducir la liberación de endocannabinoides desde el terminal post sináptico que a su vez disminuye la actividad sináptica al actuar en los receptores pre sinápticos. Experimentalmente se suele utilizar un procedimiento de despolarización neuronal que emula la actividad sináptica para inducir la liberación de endocannabinoides (Wilson and Nicoll 2001). Tras esta despolarización se observa una disminución de la liberación de neurotransmisores, tanto inhibidores (DSI, del inglés *depolarization supression of inhibition*) como excitadores (DSE, del inglés *depolarization supression of excitation*). De esta manera, los endocannabinoides liberados en respuesta a la actividad sináptica pueden modular la transmisión sináptica a corto plazo; además, durante la inducción de algunos tipos de depresión a largo plazo (eCB-LTD) se necesita la activación de receptores CB1 en el terminal pre sináptico (Chevaleyre, Heifets et al. 2007). Si bien el mecanismo anteriormente descrito sería un mecanismo de liberación de endocannabinoides dependiente de actividad, los endocannabinoides también se liberan de manera tónica (Auclair, Otani et al. 2000).

Los receptores CB2, por su parte, se encuentran en células del sistema inmune y de distintos órganos como el páncreas, el bazo o el corazón. En el sistema nervioso central su expresión esta menos estudiada pero hay evidencias de que estos receptores aparecen en las células de la microglía y neuronas (Nunez, Benito et al. 2004, Van Sickle, Duncan et al. 2005, Mackie 2008). Además, en el sistema nervioso los cannabinoides pueden activar a los receptores de vaniloides de tipo 1 (TRPV1) que aparecen en aferentes sensoriales periféricas y cuya

activación puede regular la sensación de dolor. Los TRPV1 también se encuentran en el sistema nervioso central y su activación regula la actividad sináptica y neuronal, pero con la diferencia de que los receptores TRPV1 aparecen en el terminal post sináptico y no en el terminal pre sináptico, donde están los receptores CB1 (Caterina and Julius 2001).

Sistema endocanabinoide y las células de glía.

La glía también es un componente funcional del sistema endocanabinoide (Stella 2004, Stella 2009, Navarrete, Diez et al. 2014, Metna-Laurent and Marsicano 2015); no solo la maquinaria de producción de endocanabinoides se encuentra presente en astrocitos (Rodriguez, Mackie et al. 2001) y células de la microglía (Carrier, Kearn et al. 2004), además, tanto la microglía (Facchinetti, Del Giudice et al. 2003) como los astrocitos (Rodriguez, Mackie et al. 2001, Salio, Doly et al. 2002) presentan receptores CB1 en sus membranas plasmáticas. En la región CA1 del hipocampo, la liberación endógena de endocanabinoides no solo actúa en los receptores CB1 neuronales sino también sobre los receptores CB1 astrocitarios (Navarrete and Araque 2008, Han, Kesner et al. 2012). La activación de receptores astrocitarios en esta región produce aumentos de calcio intracelular y la liberación del gliotransmisor glutamato, el cual genera corrientes NMDA en las neuronas de CA1 además de modular la liberación de neurotransmisores en las terminales pre sinápticas de las colaterales de Schaffer mediante la activación de receptores metabotrópicos de glutamato (mGlu1) (Navarrete and Araque 2008, Navarrete and Araque 2010). En estos terminales pre sinápticos el glutamato liberado por los astrocitos modula la transmisión sináptica tanto a corto como a largo plazo (Navarrete and Araque 2010, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015).

Los receptores CB1 se acoplan principalmente a proteínas $G_{i/o}$, sin embargo, estos también pueden estar acoplados a proteínas $G_{q/11}$ que activan a PLC (Lauckner, Hille et al. 2005). De hecho, al menos en el hipocampo, la respuesta de calcio astrocitaria mediada por receptores CB1 es dependiente de la actividad de PLC pero no de la actividad de receptores $G_{i/o}$ (Navarrete and Araque 2008).

Así, en el hipocampo, la liberación de endocannabinoides produce la liberación de glutamato que genera una potenciación de la transmisión sináptica a corto plazo mediada por astrocitos. Además, los endocannabinoides deprimen la transmisión sináptica en sinapsis adyacentes por un efecto directo sobre los receptores presentes en las terminales pre sinápticas (Navarrete and Araque 2010). Pero allí donde los endocannabinoides no difunden se observa la modulación de la transmisión sináptica dependiente de astrocitos, bien sea por la difusión de la señal de calcio originada por la activación de los receptores CB1 astrocitarios o la difusión de los gliotransmisores liberados como consecuencia de esta señal de calcio. De esta forma, la señalización por endocannabinoides puede producir un efecto de depresión de la transmisión sináptica en las sinapsis cercanas a la sinapsis productora de endocannabinoides (menos de 20 μm entre el soma de la neurona productora de endocannabinoides y el soma de la neurona en la que se observa el efecto) pero un efecto opuesto de aumento de la transmisión sináptica en sinapsis relativamente más lejanas (más de 70 μm) gracias a la propagación de la señal astrocitaria (Navarrete and Araque 2010).

Además, la activación de estos receptores CB1 astrocitarios es la responsable de la depresión a largo plazo en la transmisión sináptica en CA1 y la deficiencia en la memoria de trabajo que se produce tras la aplicación intra peritoneal de THC (Han, Kesner et al. 2012). No solo los astrocitos del hipocampo presentan receptores CB1, también en la corteza cerebral se ha demostrado la implicación de estos receptores en procesos de plasticidad sináptica a largo plazo (Min and Nevian 2012); y en el núcleo estriado participan en procesos de potenciación de la transmisión sináptica a corto plazo (Martin, Bajo-Graneras et al. 2015), en ambos casos mediante la liberación del gliotransmisor glutamato.

Sistema endocanabinoide en la amígdala

El cannabis y sus derivados producen una amplia variedad de efectos, afectando desde el control de la ingesta al dolor y el procesamiento cognitivo (Katona and Freund 2012). Sin embargo, cuando se pregunta a los consumidores de marihuana cual es la principal razón que motiva su consumo, la respuesta mayoritaria es “me relaja” (Tart 1970). Esta

respuesta común es un reflejo del importante papel que juega el sistema endocanabinoide en la regulación de procesos relacionados con el estrés, la ansiedad y el miedo. Así los estudios científicos de las últimas décadas han demostrado que los endocannabinoides tienen un importante papel en la regulación de los procesos de miedo y ansiedad (Ramikie and Patel 2012, Lutz, Marsicano et al. 2015), consecuencia de la gran expresión de receptores de CB1 en áreas cerebrales relacionadas con el procesamiento del miedo, como son la amígdala, el hipocampo y la neo-corteza cerebral (Marsicano and Lutz 1999, Moldrich and Wenger 2000, Katona, Rancz et al. 2001). En concreto en la amígdala, se ha demostrado que el sistema endocanabinoide regula la transmisión sináptica tanto en BLA (Marsicano, Wotjak et al. 2002, Huang, Wang et al. 2003, Zhu and Lovinger 2005) como en CeA (Kamprath, Romo-Parra et al. 2011, Ramikie, Nyilas et al. 2014). Además, tanto en el miedo como en la ansiedad, la aplicación de agonistas exógenos del receptor CB1 produce efectos bifásicos en el comportamiento. Bajas dosis de agonistas del receptor CB1 producen un efecto ansiolítico mientras que altas dosis producen efectos ansiogénicos (Moreira, Grieb et al. 2009, Rey, Purrio et al. 2012). En cuanto al condicionamiento del miedo, bajas dosis producen un descenso en la expresión del *freezing* y un aumento en la evasión activa, mientras que altas dosis producen un aumento en la expresión del comportamiento de *freezing* y un descenso en la evasión activa (Metna-Laurent, Soria-Gomez et al. 2012). Además se ha demostrado (mediante métodos farmacológicos y genéticos) que la disminución de la actividad del receptor CB1 genera un déficit en la extinción del miedo condicionado (la disminución en el *freezing* como respuesta a la presentación repetitiva del estímulo condicionado en ausencia del estímulo no condicionado) (Marsicano, Wotjak et al. 2002, Lutz, Marsicano et al. 2015). Estudios posteriores han demostrado las implicaciones de los receptores CB1 en BLA en la extinción del miedo condicionado a largo plazo y en CeA en la extinción del miedo a corto plazo (Marsicano, Wotjak et al. 2002, Kamprath, Romo-Parra et al. 2011).

La activación de receptores de CB1 en BLA genera una depresión de la transmisión GABAérgica tanto espontánea como evocada (Huang, Wang et al. 2003, Ruehle, Remmers et al. 2013), además de mediar procesos de depresión a largo plazo sobre las sinapsis GABAérgicas

que producen las interneuronas de BLA sobre las neuronas principales glutamatérgicas (Marsicano, Wotjak et al. 2002, Chevalleyre, Heifets et al. 2007). La activación de receptores de CB1 también provoca una depresión de las sinapsis glutamatérgicas en BLA a corto plazo (Ruehle, Remmers et al. 2013), además de estar implicados en procesos de plasticidad a largo plazo (Huang, Wang et al. 2003). Los receptores de CB1 juegan también un papel importante en CeA; si bien en el primer estudio que analizó la influencia de agonistas del receptor CB1 en CeA no se encontraron efectos sobre la transmisión sináptica GABAérgica (Katona, Rancz et al. 2001), estudios posteriores demostraron una disminución en dicha transmisión por agonistas del receptor CB1 además de un aumento debido al bloqueo de receptores CB1. Además, se ha demostrado la presencia de DSI en las sinapsis GABAérgicas que proyectan de CeL a CeM y de DSE en las sinapsis glutamatérgicas que proyectan de BLA a CeM, aunque éstas necesitan despolarizaciones más largas que las necesarias para inducir la DSI en las sinapsis GABAérgica (Kamprath, Romo-Parra et al. 2011).

En conjunto, estos estudios ponen de manifiesto la importante y compleja modulación del sistema endocanabinoide sobre el miedo y la ansiedad, en la cual distintas dosis de agonistas generan efectos opuestos y donde los receptores CB1 ejercen funciones en distintas áreas cerebrales, evocando distintos efectos en distintas poblaciones neuronales dentro del mismo área. Pero en este complejo escenario aún queda un elemento cuya implicación necesita estudiarse: el papel de los receptores CB1 astrocitarios y su participación en la regulación de la función de la amígdala.

II. OBJETIVOS

Habiéndose observado un importante papel de la sinapsis tripartita en distintas regiones del sistema nervioso, nuestro primer objetivo fue **elucidar el papel de los astrocitos en la modulación de la transmisión sináptica en la amígdala**. Para ello primero investigamos la comunicación neurona-astrocito, estudiando cómo la actividad neuronal puede influir la señal de calcio intracelular en los astrocitos, y posteriormente la comunicación astrocito-neurona, estudiando cómo la actividad astrocitaria influye en la actividad sináptica y neuronal.

El segundo objetivo fue el **estudio de la implicación de los astrocitos en el sistema endocanabinoide en la amígdala central**, determinando si los astrocitos de este área responden mediante la activación de receptores CB1 a la liberación de endocannabinoides, y si esta activación produce efectos en la transmisión sináptica, elucidando si, como en otras áreas, el astrocito es un elemento activo en el sistema endocanabinoide de la amígdala central.

Se conoce el papel de las células de glía sobre distintas sinapsis pertenecientes a distintas poblaciones neuronales, habiéndose observado diversos efectos de la actividad astrocitaria en distintas poblaciones pertenecientes a distintas áreas del sistema nervioso central, pero aún no se ha elucidado el efecto de la activación de los astrocitos sobre distintas sinapsis en la misma población neuronal. Por eso nuestro tercer objetivo fue **estudiar la modulación sobre distintas sinapsis con una valencia opuesta -como las sinapsis excitadoras e inhibitoras- de una misma población neuronal**.

Se ha estudiado el papel de las células de la glía en la conducta dependiente de regiones del sistema nervioso central como el hipocampo, la corteza cerebral o el cerebelo. Aun así, para comprender el papel de los astrocitos en estas áreas se necesita un análisis más exhaustivo de la relación entre la actividad astrocitaria y su función en el procesamiento de la información. La complejidad del establecimiento de una función clara y medible relacionada con la actividad sináptica en otras áreas nos llevó a investigar-el papel de los astrocitos en un área en la que disponemos de menor conocimiento sobre las células de la glía, pero cuya actividad tiene unas consecuencias claras y observables, como es CeM. CeM es la principal estructura de salida de la amígdala, cuya implicación en el condicionamiento del miedo se ha

estudiado y reproducido ampliamente. Por ello nuestro cuarto objetivo fue **estudiar el papel de los astrocitos en la regulación la actividad neuronal de CeM, así como sobre el fenotipo comportamental derivado de la actividad de estas neuronas.**

III. MÉTODOS

Declaración ética.

Los procedimientos para el manejo y el sacrificio de los animales siguieron las guías del Comité de cuidado y uso de animales de la Universidad de Minnesota (IACUC) y los protocolos fueron supervisados por los veterinarios oficiales de la Universidad de Minnesota.

Animales.

Los ratones fueron expuestos a ciclos de 12 horas de luz y doce horas oscuridad, con un máximo de 4 animales por jaula. Para los experimentos de electrofisiología en rodaja se usaron ratones C57/BL6 macho de 14 a 21 días de edad. Para experimentos específicos las rodajas se obtuvieron de ratones GFAP-CB1R-KO y de ratones GAP-CB1R-Wt de 12-20 semanas de edad y también de ratones $IP_3R2^{-/-}$ de 14 a 21 días de edad, generosamente donados por el Dr. Zimmer y el Dr. J. Chen respectivamente (Zimmer, Zimmer et al. 1999, Li, Zima et al. 2005). Con respecto a los experimentos de la activación de los receptores diseñados exclusivamente activados por drogas diseñadas (DREADDs), las rodajas se obtuvieron de animales de 9 a 20 semanas de edad.

Los ratones GFAP-CB1R-KO y GAP-CB1R-Wt provienen de ratones que contenían el gen que codifica para la proteína CB1R flanqueado por la secuencia flox ($Cnr1^{f/f}$) cruzados con animales GFAP-CreERT2, obteniendo ratones $CB1R^{f/f};GFAP-CreERT2$ y ratones $CB1R^{f/f}$, denominados GFAP-CB1R-KO y GAP-CB1R-Wt respectivamente. Debido que la proteína CreERT2 es inactiva en ausencia de tratamiento con tamoxifeno, la eliminación de los genes CB1R se obtuvo por inyecciones diarias de tamoxifeno (1 mg, i.p.) disuelto a una concentración de 10mg/ml³ durante 8 días (Han, Kesner et al. 2012).

Preparación de rodajas de cerebro de ratón.

Los animales fueron decapitados, tras lo cual el cerebro, expuesto por craneotomía, se extrajo y se colocó rápidamente en una cámara de corte con líquido cefalorraquídeo artificial (LCA) enfriado con hielo a una temperatura de aproximadamente 4°C y continuamente burbujeado con

carbógeno (95% O₂ y 5%CO₂). Posteriormente se procedió a la obtención de rodajas coronales con la ayuda del vibrátomo Leica VT1200S. Una vez obtenidas las rodajas, estas fueron incubadas a temperatura ambiente en LCA continuamente burbujeado con carbógeno durante un mínimo de 30 minutos. A continuación las rodajas fueron transferidas a una cámara de registro de inmersión para la elaboración experimental que permitía el alojamiento de 1 – 2 ml de LCA que se perfundía a un ritmo de 2 ml cada minuto. El LCA era continuamente burbujeado con carbógeno. Las rodajas localizadas en la cámara de registro se visualizaban con un microscopio Olympus BX50WI equipado con un sistema de contraste de interferencia diferencial (DIC) y objetivos de 4x y 40x que permitían la observación de los núcleos cerebrales y las neuronas individuales respectivamente. La composición del LCA era (en mM): NaCl 124, KCl 3, KH₂PO 1.25, MgSO₄ 2, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 2 y glucosa 10. El pH estaba entre 7,3 y 7,4.

Registros electrofisiológicos en rodajas de cerebro de ratón.

Las neuronas de CeM se registraron usando la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell* y en la modalidad de fijación de voltaje. Para el registro se utilizaron pipetas obtenidas a partir de capilares de borosilicato con filamento interno (Diámetro externo: 1.5 mm; Diámetro interno: 0.86 mm) los cuales generaron pipetas de registro de una resistencia entre 3 y 10 M Ω . Estas pipetas se llenaron con una solución intracelular que contenía (en mM): K-gluconato 135, KCl 10, Hepes-K 10, MgCl 1, ATP-Na₂⁺ 2. El pH estaba entre 7.3 y 7.4 y la osmolaridad entre 280 y 290 mOsm/l.

Los registros electrofisiológicos se obtuvieron con amplificadores PC-ONE (Dagan Instruments, Estados Unidos). Las capacitancias rápidas y lentas de la membrana celular fueron neutralizadas y la resistencia en serie compensada. El potencial de membrana de las células se mantuvo entre -70 y -80 mV. Las señales fueron filtradas a 1KHz y transferidas con una frecuencia de muestreo de 10KHz a un ordenador a través de una tarjeta de conversión analógico-digital DigiData 1440 (Axon Instruments, Estados Unidos). Para la eliminación del ruido proveniente de la corriente alterna (60 Hz), las señales se filtraron con un HumBug (Quest Scientific Instruments Inc., Canadá). Para la generación de

pulsos, adquisición y almacenamiento de datos se empleó el programa pCLAMP 10.2 (Axon Instruments, Estados Unidos). A lo largo de los experimentos las resistencias en serie y de acceso se monitorizaron aplicando un pulso de voltaje de -5 mV durante 5 minutos. Se descartaron los experimentos en los que la resistencia de acceso y en serie, el potencial de membrana en reposo o el artefacto de estimulación cambiaron más del 20%.

Estimulación sináptica y registro de corrientes excitadoras e inhibitoras.

Para la estimulación bipolar local se utilizaron capilares theta con una punta de 2 a 5 μm de diámetro llenados con LCA, conectados a un estimulador S-910 por una unidad de asilamiento. Las corrientes inhibitoras post sinápticas GABAérgicas (IPSCs) registradas en las neuronas de CeM fueron evocadas estimulando CeL y aisladas gracias a la presencia de antagonistas de los receptores de glutamato AMPAR y NMDAR (CNQX 20 μM y AP5 50 μM respectivamente). Las corrientes excitadoras post sinápticas glutamatérgicas fueron evocadas estimulando en BLA y aisladas gracias a la presencia de los antagonistas de los receptores de GABA GABA_AR y GABA_BR (Picrotoxin 0.05 mM y CGP 5 μM respectivamente). Las respuestas sinápticas a la estimulación mostraron aciertos y fallos. Los parámetros de estimulación se ajustaron para cumplir los criterios de estimulación de una o pocas terminales pre sinápticas: (i) estimulación de baja intensidad que generaba fallos en la transmisión sináptica; (ii) un pequeño movimiento de la pipeta de estimulación (10 μm) desde su posición efectiva genera un drástico cambio en las respuestas post sinápticas observadas; (iii) la amplitud de los EPSCs evocados eran similares a la amplitud de los EPSCs espontáneos; (iv) hay una clara diferencia de amplitud entre fallos y aciertos; (v) un cambio en los parámetros de estimulación de $\sim\pm 5\%$ no generó cambios en la amplitud o frecuencia de aciertos post sinápticos; (vi) disminuir la intensidad de la estimulación provoca de manera drástica una situación de fallos sin aciertos (Raastad, Storm et al. 1992, Isaac, Hjelmstad et al. 1996, Dobrunz and Stevens 1997). Las sinapsis que no cumplieron estos criterios fueron descartadas. Una respuesta sináptica se consideró como un “acierto” (es decir, el estímulo eléctrico evocó una respuesta

sináptica) cuando la amplitud de la corriente era de al menos 3 veces la desviación estándar de la línea base además de ser verificada mediante inspección visual. La probabilidad de liberación (Pr , del inglés *probability of release*) se calculó como la relación entre aciertos y respuestas totales (aciertos y fallos) y la potencia sináptica se calculó como la media de la amplitud de la corriente de los aciertos. Los estímulos fueron evocados en pulsos pareados de 250 μ s y con intervalos de 50 ms, evocados a una frecuencia de 0.33 Hz. El ratio de estímulos pareados (PPR del inglés *paired pulse ratio*), se estimó como la relación entre la segunda corriente dividida por la primera corriente pareada.

Se consideraron como parámetros sinápticos basales los de los 5 minutos previos a la aplicación de un estímulo. Los datos se expresaron como porcentajes relativos a los parámetros sinápticos basales. Los estímulos fueron diferentes en los distintos protocolos experimentales. Así, para la liberación de endocannabinoides el estímulo fue una despolarización neuronal a 0 mV durante 10 s. Para las aplicaciones locales de agonistas de receptores (como el CNO, 1 mM) se colocó una micro pipeta a 100-150 μ m de la zona registrada, aplicando una presión de 0.5 bar durante 2 segundos. En todos los experimentos se confirmó la ausencia de movimientos en el tejido a consecuencia de la aplicación local.

En el protocolo de pares de registro se registraron de manera simultánea dos neuronas situadas a una distancia de entre 80 y 200 μ m. Una neurona fue despolarizada (homoneurona) para la liberación de endocannabinoides y en la neurona pareada (heteroneurona) se monitorizó tanto la probabilidad de liberación como la potencia sináptica de los EPSCs y los IPSCs. Se comprobó que las dos neuronas no estaban conectadas directamente observando la ausencia de corriente en una neurona al despolarizar la neurona pareada.

Monitorización de niveles de calcio astrocitarios.

Los niveles de calcio de los astrocitos localizados en CeM se monitorizaron mediante la técnica de microscopia de fluorescencia, usando el indicador de calcio fluorescente fluo-4 (Molecular Probes, Eugene, OR), que es excitable por longitudes de onda dentro del

espectro visible, con un máximo de excitación a 494 nm y un máximo de emisión a 506 nm. Los niveles de emisión del indicador fluo-4 dependen de la concentración de calcio, pudiendo aumentar su emisión de fluorescencia más de 100 veces como respuesta a un cambio en la concentración de calcio. Las rodajas de cerebro de ratón se incubaron con fluo-4 AM, que es una forma lipofílica del fluo-4 capaz de atravesar las membranas, pero que una vez en el interior celular se convierte en fluo-4 gracias a la actividad enzimática celular. La incubación de fluo-4 AM 2 μ M en las rodajas de cerebro de ratón durante 30-45 minutos permitió que se cargaran astrocitos de manera diferencial, confirmado tanto por el marcaje de sulforodamina 101 como por las propiedades electrofisiológicas de las células cargadas, las cuales presentaban ausencia de disparo de potenciales de acción, una relación corriente-voltaje lineal y una baja resistencia de acceso (Kang, Jiang et al. 1998, Perez-Alvarez, Navarrete et al. 2014).

La señal de calcio de los astrocitos mediante el indicador fluo-4 se monitorizó utilizando un LED a 470 nm para excitar la molécula de fluo-4 durante 100 ms y obtener imágenes procedentes de la emisión de dicha molécula a 1-2 Hz. La señal emitida se monitorizó usando una cámara CCD (Hamamatsu photonics, Japón), sincronizada con el LED. Las medidas se cuantificaron usando el software ImageJ. La señal de calcio se midió en soma y procesos proximales de los astrocitos cargados con la molécula de fluo-4 como fluorescencia dependiente de su señal basal ($\Delta F/F_0$). Se consideró que una célula estaba experimentando un evento de aumento de calcio intracelular cuando la señal de calcio aumentó 3 veces la desviación estándar de la señal de calcio basal. En algunos casos la señal de fluorescencia fue medida con un microscopio confocal multi fotón Leica SP5.

La señal de calcio se cuantificó como la probabilidad de eventos de calcio. La probabilidad de eventos de calcio se calculó como el número de astrocitos empezando un evento de calcio en un periodo de tiempo dividido por el número total de astrocitos en el área registrada. Los periodos de tiempo utilizados para la cuantificación fueron de 10 segundos. El momento de aparición de un evento de calcio se consideró como el principio de la señal del evento de calcio. Para medir los efectos de los distintos estímulos se comparó la probabilidad de eventos de calcio antes y después del estímulo. Los valores se obtuvieron en al

menos 4 rodajas de ratón y con entre 10 y 15 astrocitos por rodaja. Para la cuantificación del efecto de la perfusión de CNO la señal de calcio se midió como frecuencia de eventos de calcio, cuantificada como el número de eventos en cada astrocito por minuto.

Cirugías para la administración de vectores virales.

Se utilizaron ratones C57/BL6 de 6 a 9 semanas de edad. Los animales fueron anestesiados mediante la aplicación intraperitoneal de una mezcla de Ketamina/Xylazina, a una concentración final de 100 mg/Kg y 10 mg/Kg respectivamente. La temperatura y las constantes vitales del animal se monitorizaron continuamente durante la cirugía. Los animales se colocaron en un soporte estereotáxico tras lo cual se realizaron perforaciones localizadas en el cráneo. Se inyectaron virus asociados con el adenovirus de serotipo 8 (AAV8), que inducen la expresión de receptor hM3D asociado a proteínas Gq y la proteína fluorescente mCherry. El virus AAV8-GFAP-hM3D-mCherry (obtenido de Gene Therapy Vector Core at University of North Carolina) se inyectó en una concentración de $8, 2 \times 10^{12}$ moléculas virales por ml. Las inyecciones se realizaron en la porción medial de la amígdala central (CeM), para lo que se usaron las siguientes coordenadas estereotáxicas: anterior-posterior -1 mm; medial-lateral ± 2.75 mm; dorsal-ventral -5.15 mm, medido desde Bregma. Se aplicó un volumen de entre 300 y 500 nl a una velocidad de 100 nl por minuto con el sistema MicroSyringe Pump Controller (WPI) a un flujo constante acoplando el sistema a una jeringuilla Hamilton Gasstight. Tres semanas después de la aplicación del virus se confirmó la correcta expresión y localización del área de transfección vírica. Solo se utilizaron los animales en los que la expresión del virus estaba localizada principalmente en la porción medial de la amígdala central, sin grandes filtraciones a otras áreas.

Registros electrofisiológicos in vivo.

Los ratones fueron anestesiados con uretano (1.8 g/Kg de peso del ratón, inyectado de manera intra peritoneal) y colocados en un soporte estereotáxico. La temperatura del ratón fue mantenida a 37 ± 1 °C con una manta eléctrica y la respiración fue constantemente monitorizada. Se utilizó un electrodo de tungsteno de 5M de impedancia a una frecuencia de 1000Hz para registros unitarios múltiples, que fue

estereotáxicamente localizado en las mismas coordenadas que las utilizadas para la administración del virus (anterior-posterior: -1 mm; medial-lateral: ± 2.75 mm; dorsal-ventral, -5.15 mm, con Bregma como referencia). La señal fue amplificada y filtrada a 300Hz y 3000Hz usando un amplificador diferencial (Modelo 3000 AC/DC, AM system). Las señales fueron digitalizadas a 10 KHz usando una Digidata 1550A (Axons instruments) y almacenadas en un ordenador para el análisis con el programa pCLAMP 10.2 (Axon Instruments). Los potenciales de acción fueron detectados posteriormente. Para que una señal fuera considerada un potencial de acción la amplitud de la señal tenía que ser 3 veces la desviación estándar del ruido de la señal basal y fueron verificados mediante inspección visual.

Condicionamiento del miedo y laberinto elevado en forma de cruz.

El condicionamiento del miedo se evalúa midiendo la respuesta de miedo, para medir esta respuesta se utiliza el tiempo que el animal pasa en un estado de freezing o parálisis. Se mide la respuesta al estímulo condicionado previamente asociado con el estímulo no condicionado. La adquisición y el análisis de los datos fueron semi automatizados a través de la adquisición de video en un fear-conditioning apparatus (Med. Associates, Inc). En el día del condicionamiento del miedo los ratones se expusieron a una serie (5 pares con 60 segundos entre estímulos) de estímulos condicionados (80db de tono y luz) que terminaban junto a la presentación de un ligero estímulo eléctrico (0.7 mA durante 1 segundo). 24 horas después los animales fueron inyectadas con CNO (2mg/Kg del animal, intra peritoneal) o con salino 30 minutos antes del test. El test consistió en colocar los animales en una cámara con elementos contextuales alterados (suelo, pared y olor) para evitar la evocación de una respuesta de miedo contextual, y la aplicación del estímulo condicionado en ausencia del estímulo no condicionado durante 3 minutos. Este test fue repetido 24 horas después sin la aplicación de CNO o salino.

Para la tarea del laberinto elevado en forma de cruz (EPM del inglés *elevated plus maze*) se utilizó un elevated plus maze apparatus (Med. Associates Inc.). Los test fueron evaluados bajo condiciones de baja luminosidad, con LEDs de baja intensidad sobre los brazos abiertos, generando aproximadamente 50lux de intensidad en los extremos de

los brazos abiertos. Los test duraron 5 minutos y el movimiento de los animales fue monitorizado y analizados mediante el software ANY-maze (Stoelting Co.). El tiempo en los brazos abiertos se cuantificó como el tiempo que el animal pasó en los brazos abiertos, dividido entre el tiempo que el animal pasó en el conjunto de los brazos (abiertos y cerrados). Las entradas en brazos abiertos y cerrados y la distancia total recorrida por el animal fueron evaluadas por el software ANY-maze. Los ratones fueron inyectados con CNO (2mg/Kg, intra peritoneal) o salino 30 minutos antes del test.

Drogas y reactivos.

N-(Piperidin-1-il)-5(4-iodofenil)-1(2,4-diclorofenil)-4-metil-1H-pirazol-3-carboxamida (AM-251), clorhidrato de piridina 2-Metil-6-(feniletinil) (MPEP), (S)-(+)-ácido -Amino-4-carboxi-2-metilbenzeneacético (LY367385), ácido (2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Diclorofenil)etil]amino-2-hidroxiopropil](fenilmetil)fosfónico (CGP 55845) fueron adquiridos a Tocris Cookson (Bristol, Reino Unido), Fluo4-AM. Todas las demás drogas y reactivos fueron suministrados por Sigma.

Técnicas inmunohistoquímicas

Ratones C57BL/6J transfectados con el vector AAV8-GFAP-hM3D-mCherry fueron perfundidos con 0.1 M PBS y seguidamente por 4% paraformaldeído (6 ratones). Los cerebros fueron extraídos y fijados en paraformaldeído durante una noche. Posteriormente los cerebros fueron seccionados en rodajas de 50 µm seguidamente expuestas a 0.1% Triton X-100 en PBS (1 h) y anticuerpos de conejo específicos para GFAP (1:1,000; Sigma; G9269), anticuerpos de ratón específicos para NeuN (1:500; Millipore; MAB377), anticuerpos de conejos específicos para NeuN (1:500; Millipore; MABN140), anticuerpos de ratón específicos para NG2 (1:500; Millipore; AB5320), anticuerpos de conejo específicos para Iba1 (1:500; Dako; 019-19741), y anticuerpos de ratón específicos para CC1 (1:500; Calbiochem; OP80) durante una noche (4 °C). Tras esto, las rodajas se incubaron por 3 horas con Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:500; Invitrogen; A11034), Alexa Fluor 405 goat anti-mouse (1:500; Invitrogen; A31553) y Cy3 goat anti-mouse (1:500), tras lo que se montaron en un portaobjetos con medio de montaje (Vector Labs). Las imágenes fueron adquiridas en microscopio

multifotón Leica SP5. La especificidad de la expresión de los DREADDs en astrocitos se confirmó por la co-localización de la proteína mCherry en células que expresaban GFAP (99.36%, 785 de 790 células que expresaron mCherry). De las células que expresaron mCherry pero no expresaron GFAP, 3 se identificaron como neuronas por su co-localización con NeuN (0.37%) y 2 se identificaron como oligodendrocitos al co-localizar con CC1 (0.25%). Ninguna célula se identificó con microglía (al no co-localizar con Iba1) o con células precursoras de oligodendrocitos (al no co-localizar con NG2).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico y la representación de los resultados se realizaron mediante los programas Excel (Microsoft Office) y Sigma Plot 12.5. La señal de calcio fue analizada y representada con los programas ImageJ y Photoshop 7.0. Los datos se expresan como el promedio y las barras de error se corresponden con el error estándar de la media (SEM). Los datos se analizaron mediante el test paramétrico t de student.

IV. RESULTADOS

1. Los astrocitos forman parte del sistema endocanabinoide.

Los endocannabinoides (eCBs) desempeñan un papel crucial en el sistema nervioso central, interviniendo en procesos de transmisión y plasticidad sináptica, además de jugando un importante papel en la regulación del comportamiento (Wilson and Nicoll 2001, Chevalleyre and Castillo 2003, Chevalleyre, Takahashi et al. 2006, Castillo, Younts et al. 2012, Lutz, Marsicano et al. 2015). Especialmente, los endocannabinoides juegan un importante papel en la regulación del miedo y la ansiedad (Marsicano, Wotjak et al. 2002, Metna-Laurent, Soria-Gomez et al. 2012, Rey, Purrio et al. 2012, Lutz, Marsicano et al. 2015). Estudios recientes sitúan a los astrocitos como parte integral del sistema endocanabinoide, siendo responsables de regulaciones de la transmisión sináptica dependiente de eCBs (Navarrete and Araque 2010, Martin, Bajo-Graneras et al. 2015) y de procesos de plasticidad sináptica dependiente de eCBs (Min and Nevian 2012, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015). Además los astrocitos son responsables de modulaciones del comportamiento dependientes del sistema endocanabinoide (Han, Kesner et al. 2012). Por estos motivos nos propusimos estudiar la implicación de los astrocitos en la regulación de la transmisión sináptica dependiente del sistema endocanabinoide en la amígdala central y sus efectos sobre el comportamiento relacionado con la actividad de esta área cerebral.

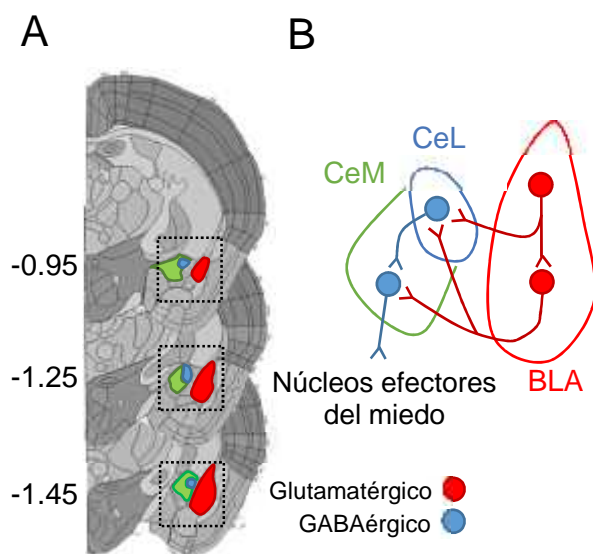


Figura 4: Distintas secciones del cerebro del ratón que contienen el complejo amigdalóide. (A) Imágenes modificadas de Allan Brain Institute Atlas que representan de manera esquemática la amígdala y sus principales subnúcleos en distintas secciones del cerebro del ratón. En cada sección se expresa la distancia a Bregma. **(B)** Representación esquemática de la amígdala y sus principales subnúcleos (CeM; verde. CeL; azul. BLA; rojo)

Comunicación neurona astrocito mediada por endocannabinoides.

Para estudiar si los astrocitos son parte del sistema endocanabinoide en la amígdala central, primero investigamos si respondían a los eCBs movilizados de manera endógena por las neuronas de CeM. Para ello, en rodajas de cerebro de ratón que contenían el complejo amigdalóide (Figura 4) evocamos la movilización de eCBs mediante un protocolo de despolarización neuronal (Wilson and Nicoll 2001, Navarrete and Araque 2008, Kamprath, Romo-Parra et al. 2011, Ramikie and Patel 2012) mientras monitorizábamos los niveles de calcio intracelular en los astrocitos, identificados por el marcador SR101, mediante el indicador de calcio fluorescente Fluo-4 (Navarrete and Araque 2008). La despolarización de las neuronas de CeM fue de 10 segundos a 0 mV, pues esta es la despolarización necesaria para observar el fenómeno de la DSE en las neuronas de CeM (Kamprath, Romo-Parra et al. 2011). Esta despolarización provocó aumentos en los niveles de calcio astrocitarios (Figura 5 A y B) cuantificados como un aumento en la probabilidad de eventos de calcio ($n=89$ astrocitos; $n=7$ rodajas; $p=0.003$) (Figura 5 C).

Para investigar si este aumento de calcio era dependiente de la activación del receptor de endocannabinoides el experimento se repitió en presencia del antagonista del receptor CB1, el compuesto AM251 ($2\mu\text{M}$). La presencia de este compuesto provocó que la despolarización neuronal de las neuronas de CeM no evocara aumentos de calcio en los astrocitos de CeM ($n=73$ astrocitos; $n=4$ rodajas; $p=0.54$) (Figura 5D). Este resultado demuestra que los aumentos de calcio observados tras la despolarización neuronal dependen de la activación del receptor de CB1, si bien, la localización del receptor no queda clarificada. Es por eso que tras concluir este experimento decidimos estudiar si los aumentos de calcio en respuesta a la despolarización neuronal dependen de la activación de receptores CB1 astrocitarios o neuronales. Para ello usamos una línea transgénica de ratones (GFAP-CB1R^{-/-}) que carecen de la expresión del receptor CB1 en astrocitos (Han, Kesner et al. 2012). En estos ratones la despolarización neuronal no evocó aumentos de calcio en los astrocitos ($n=175$ astrocitos; $n=10$ rodajas; $p=0.63$) (Figura 5D). Sin embargo en los compañeros de camada de estos ratones que no tenían la expresión del receptor de CB1 alterada (GFAP-CB1^{WT}), la despolarización neuronal evocó

aumentos de calcio en los astrocitos (n=97 astrocitos; n=9 rodajas; p=0.006) (Figura 5D). De estos resultados podemos concluir que la el aumento de calcio en los astrocitos en respuesta a la despolarización neuronal se produce por la activación de los receptores CB1 en los astrocitos. De forma que los eCBs liberados tras la despolarización neuronal actúan de manera directa sobre los receptores CB1 astrocitarios provocando aumentos de calcio intracelulares.

Para investigar la fuente del calcio tras la activación de los receptores CB1 utilizamos otra línea transgénica, el ratón $IP_3R2^{-/-}$ en el que se impide la expresión del receptor reticular de IP_3 tipo 2 (Li, Zima et al. 2005). En el sistema nervioso central este receptor está predominantemente expresado en los astrocitos, alterando la señal de calcio dependiente de proteínas G, lo cual ha llevado a su utilización para el estudio de la función de señal de calcio astrocitaria (Petravicz, Fiacco et al. 2008, Agulhon, Boyt et al. 2013, Perez-Alvarez, Navarrete et al. 2014, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015, Gomez-Gonzalo, Martin-Fernandez et al. 2017). En este modelo observamos que la despolarización neuronal es incapaz de aumentar los niveles de calcio astrocitarios (n=74 astrocitos; n=8 rodajas; p=0.73) (Figura 5D). De estos resultados podemos concluir que la activación de los receptores CB1 astrocitarios provoca aumentos de calcio dependientes de la movilización del calcio almacenado en el retículo endoplásmico.

En conjunto estos resultados demuestran que los astrocitos de CeM son capaces de percibir la movilización de eCBs por las neuronas de CeM, y responden a esta señal aumentando los niveles de calcio intracelulares. Este resultado sitúa a los astrocitos como parte del sistema endocanabinoide en la amígdala central, al comprobarse que la actividad de los astrocitos está influenciada por la de dicho sistema.

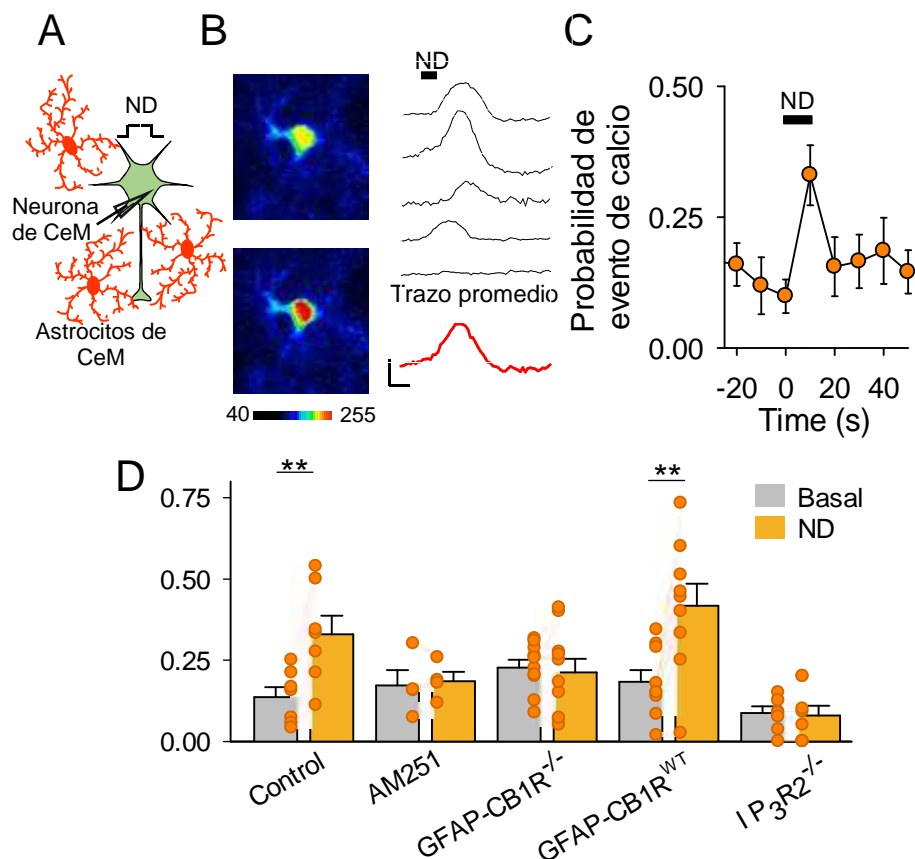


Figura 5: Respuesta de los astrocitos de CeM a los endocannabinoides movilizados por las neuronas de CeM. (A) Representación esquemática de la condición experimental, representando astrocitos de CeM y la neurona despolarizada (B) Imágenes en pseudocolor representativas de los niveles de calcio astrocitarios antes y después de la despolarización neuronal. Barra escala 10 μ m. (C) Probabilidad de un evento de calcio en los astrocitos de CeM en condiciones basales y en respuesta a una despolarización neuronal. (D) Probabilidad de eventos de calcio en condiciones basales y tras la despolarización neuronal en las distintas condiciones experimentales. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan la probabilidad de evento de calcio antes y después de la despolarización neuronal en cada una de las rodajas utilizadas para obtener los valores promedio.

El sistema endocanabinoide y su efecto en la transmisión sináptica mediado por astrocitos.

Para el estudio del efecto de la activación de los astrocitos mediante eCBs en la transmisión sináptica utilizamos el protocolo de pares de registros (Navarrete and Araque 2010, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015, Martin, Bajo-Graneras et al. 2015). Este protocolo se basa en el registro simultáneo de neuronas tras lo que se despolariza una neurona para inducir la liberación de eCBs y el aumento de los niveles de calcio astrocitarios. Las terminales pre sinápticas de la neurona despolarizada se verán afectadas por la acción directa de los eCBs sobre los receptores CB1 presentes en sus membranas. Sin embargo las terminales pre sinápticas de la neurona pareada, localizadas presuntamente más lejos de la neurona despolarizada, no se ven afectadas por la acción directa de los eCBs, pero si se pueden ver afectadas por la acción de estos sobre los astrocitos, que tras aumentar el calcio pueden expandir lateralmente la señal, afectando a sinapsis de neuronas vecinas (Covelo and Araque 2016). Así la neurona despolarizada (homoneurona) nos sirve de método de activación de los astrocitos mientras que utilizamos la neurona pareada (heteroneurona) para registrar corrientes post sinápticas y observar el efecto de la activación de los astrocitos en estas corrientes. Registramos tanto corrientes excitadoras glutamatérgicas (EPSCs) evocadas por estimulación eléctrica en BLA como corrientes inhibitoras GABAérgicas (IPSCs) evocadas por estimulación eléctrica en CeL (Figura 6 A). Los EPSCs fueron aislados en presencia de GABA picrotoxina (0.05 mM) y CGP (5 μ M), antagonistas de los receptores GABA_AR y GABA_BR, respectivamente. Los IPSCs fueron aislados en presencia de los antagonistas de los receptores de glutamato CNQX (20 μ M) y AP5 (50 μ M), antagonistas de los receptores AMPAR y NMDAR respectivamente (Figura 6 A). La identidad GABAérgica o glutamatérgica de las corrientes post sinápticas en las condiciones experimentales se verificó además mediante la medición del potencial de reversión y la completa eliminación de la corriente tras la inclusión de los antagonistas de los receptores de glutamato o de GABA en cada caso.

La estimulación tanto en BLA como en CeL se ajustó para cumplir los parámetros de estimulación de una o pocas sinapsis (Figura 6

A).(Raastad, Storm et al. 1992, Isaac, Hjelmstad et al. 1996, Perea and Araque 2007, Navarrete and Araque 2010, Panatier, Vallee et al. 2011). Este método de estimulación de sinapsis se utilizó originalmente en el hipocampo, si bien su utilización se extendió a otras sinapsis en otras áreas cerebrales, como la amígdala (Braga, Aroniadou-Anderjaska et al. 2003, Delaney, Crane et al. 2007); el núcleo accumbens (Ma, Lee et al. 2014) y la corteza cerebral (Gil, Connors et al. 1999, Schoonover, Tapia et al. 2014). En estas condiciones de estimulación se observan “aciertos” y “fallos” en la transmisión sináptica. Se considera un acierto cuando la estimulación eléctrica evoca una corriente post sináptica y un fallo si no se evoca dicha corriente. Presuntamente aparecen fallos y aciertos porque de manera estocástica algunos potenciales de acción son capaces de evocar la liberación de neurotransmisor desde el terminal pre sináptico mientras que otros potenciales de acción fallan a la hora de evocar esta liberación. Utilizando esta técnica podemos

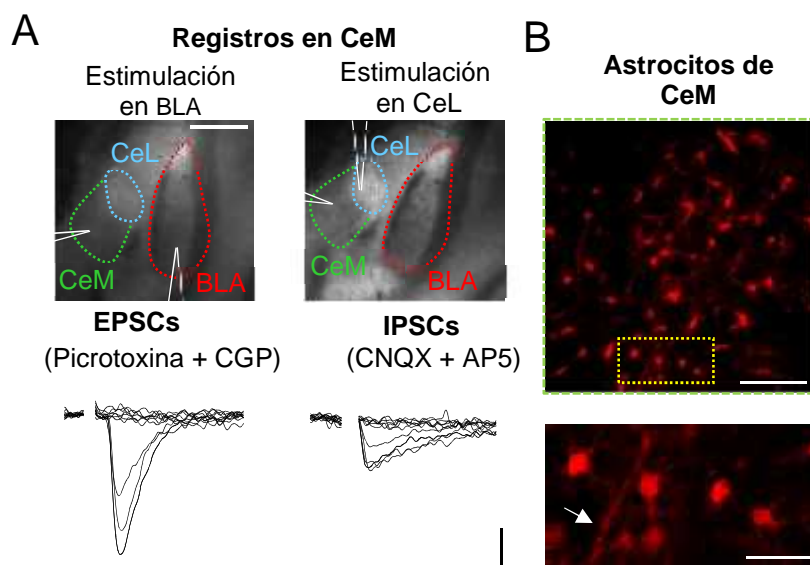


Figura 6: Corrientes obtenidas en CeM y astroцитos de CeM. (A) Arriba: Ejemplo representativo de la localización de electrodo de registro y de electrodo de estimulación en las distintas condiciones experimentales. Barra de escala 500 μm . Abajo: Corrientes registradas en estas condiciones experimentales. Barras de escala 8 pA y 25 ms **(B)** Astroцитos de CeM marcados con SR101. Barras de escala 90 y 30 μm .

observar dos características sinápticas, la probabilidad de liberación (Pr, del inglés *probability of release*), definida como la relación entre aciertos y estímulos, y la potencia sináptica, definida como la amplitud de los aciertos. Así, cambios en la probabilidad de liberación se relacionan con efectos pre sinápticos, mientras que cambios en la potencia sináptica se relacionan con efectos post sinápticos.

Efecto de la actividad astrocitaria sobre las corrientes GABAérgicas inhibitorias.

Utilizando el protocolo de pares de registros, registramos dos neuronas de CeM y en la heteroneurona registramos IPSCs GABAérgicos en la configuración de fallos y aciertos evocados por estimulación eléctrica en CeL (Figura 7 A y B). La despolarización neuronal generó un aumento transitorio en la probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL ($n=22$; $p=0.0002$) (Figura 7 C) sin afectar a su potencia sináptica ($n=22$; $p=0.88$) (Figura 8). Este efecto en la Pr sin afectar a la potencia sináptica sugiere un mecanismo pre sináptico, respaldado por un cambio en el ratio de los pares de pulso (PPR, del inglés *paired pulse ratio*) (de 1.1 ± 0.02 a 1.04 ± 0.2 ; $n=17$; $p=0.007$, t-test pareado). Este efecto en la transmisión sináptica en la heteroneurona tras la despolarización de la homoneurona presuntamente depende de la activación de los receptores CB1 astrocitarios activados por la movilización de eCBs por la homoneurona. Para investigar esta posibilidad utilizamos el antagonista de los receptores CB1 AM251. En presencia de este antagonista la despolarización neuronal no provocó ningún cambio ni en la Pr ($n=11$; $p=0.74$) ni en la potencia sináptica ($n=11$; $p=0.09$) de los IPSCs registrados en la heteroneurona (Figura 7 E). Este resultado implica a los receptores CB1 en esta modulación de la transmisión sináptica, pero para investigar la localización de los receptores CB1 recurrimos al modelo transgénico GFAP-CB1R^{-/-}, que carece de receptores CB1 en los astrocitos. En este modelo la despolarización neuronal no provocó ningún efecto probabilidad de liberación ($n=7$; $p=0.21$) ni en la potencia sináptica ($n=7$; $p=0.063$) en la heteroneurona (Figura 7 E). En cambio en los compañeros de camada GFAP-CB1^{WT} la despolarización neuronal generó un aumento en la Pr ($n=7$; $p=0.008$) sin afectar a la potencia sináptica ($n=7$; $p=0.24$) (Figura 7 E). Esto nos

indica que el efecto de la despolarización neuronal en la transmisión sináptica de la heteroneurona depende de la activación de receptores de CB1 astrocitarios. Para elucidar si este efecto también depende de la señal de calcio procedente del retículo endoplásmico, utilizamos otra línea transgénica, el ratón $IP_3R2^{-/-}$ en el que no se expresa el receptor reticular de IP_3 tipo 2. En este modelo la despolarización neuronal no generó ningún efecto en la probabilidad de liberación ($n=10$; $p=0.3$) ni en la potencia sináptica ($n=7$; $p=0.2$) en la heteroneurona (Figura 7 E). Estos resultados demuestran que el efecto de la despolarización en la transmisión sináptica depende de la activación de receptores CB1 astrocitarios y el aumento de calcio dependiente de la movilización de calcio almacenado en el retículo endoplásmico. Este efecto es consistente con lo observado en otros estudios tanto en hipocampo (Navarrete and Araque 2010) como en estriado (Martin, Bajo-Graneras et al. 2015). En estos estudios además se concluyó que tras la activación de los receptores de CB1 y los aumentos de calcio intracelulares, los astrocitos liberaban el gliotransmisor glutamato, que afectaba la transmisión sináptica actuando en receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR), específicamente los receptores mGluR1.

Para investigar cómo la activación de los receptores CB1 astrocitarios y el aumento de calcio intracelular generan un efecto en la transmisión sináptica primero estudiamos la posibilidad de que, como en los estudios anteriormente descritos, los astrocitos liberaran el gliotransmisor glutamato. Para ello realizamos el mismo protocolo en presencia de los antagonistas de los receptores mGluR5 y mGluR1, MPEP (50 μ M) y LY367385 (100 μ M), respectivamente. En presencia de estos antagonistas la despolarización neuronal aumentó la probabilidad de liberación ($n=10$, $p=0.0038$) sin afectar la potencia sináptica ($n=10$; $p=0.21$) en la heteroneurona (Figura 8). Este resultado indica que en CeM la modulación de la transmisión sináptica dependiente de la activación de los receptores CB1 astrocitarios no depende de la liberación del gliotransmisor glutamato, o al menos no de su efecto sobre receptores metabotrópicos de glutamato en el terminal pre sináptica. Para continuar investigando la señalización astrocito-neurona que produce el efecto en la transmisión sináptica, decidimos investigar el posible papel de los receptores de adenosina A2A. En el hipocampo los astrocitos liberan ATP que tras ser convertido en

IPSCs evocados en CeL

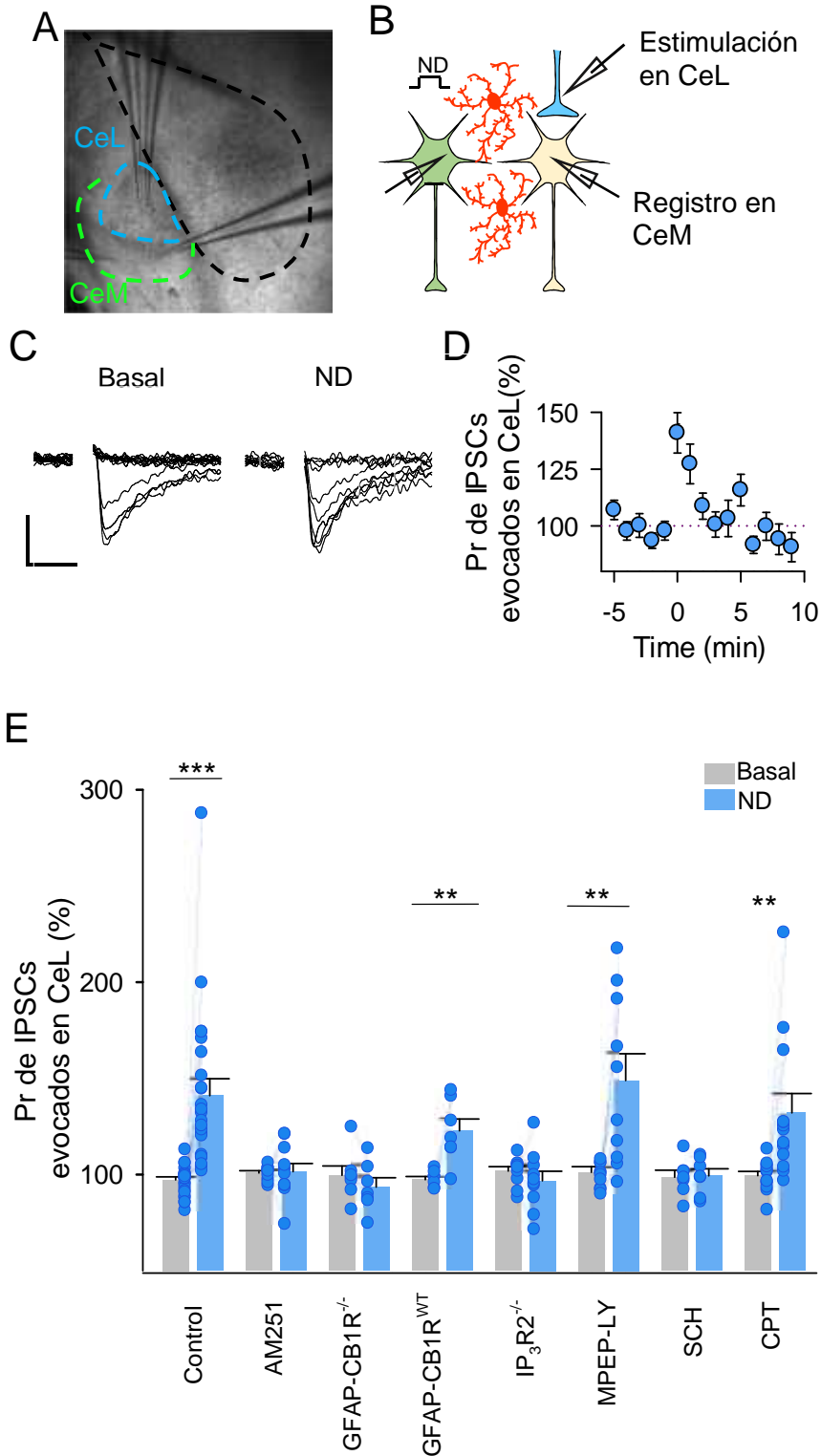


Figura 7: Efecto de la despolarización neuronal en los IPSCs evocados en CeL registrados en la heteroneurona de CeM. (A) Imagen representativa de la condición experimental, representando las pipetas de registro en CeM (verde) y la pipeta de estimulación en CeL (azul). Barra de escala 250 μ m. **(B)** Representación esquemática de la condición experimental, heteroneurona en amarillo pálido, homoneurona en verde, astrocitos en rojo y la terminales pre sinápticas procedentes de CeL en azul. **(C)** IPSCs evocados en CeL y registrados en la heteroneurona de CeM antes y después de la despolarización neuronal de la homoneurona. Barra de escala 10 pA y 25 ms. **(D)** Probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL y registrados en la heteroneurona de CeM, antes y después de la despolarización neuronal de la homoneurona de CeM. Cada punto representa la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. **(E)** Probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL en condiciones basales y tras la despolarización neuronal en las distintas condiciones experimentales. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan la probabilidad de liberación antes y después de la despolarización neuronal en cada una de las neuronas utilizadas para obtener los valores promedio.

adenosina es capaz de activar estos receptores A2A, aumentando la transmisión (Panatier, Vallee et al. 2011). Por ello realizamos el mismo protocolo experimental en presencia del antagonista del receptor A2A, SCH 58261 (100 nM). En estas condiciones, la despolarización neuronal no generó ningún efecto en la probabilidad de liberación ($n=7$; $p=0.22$) ni en la potencia sináptica ($n=7$; $p=0.86$) en la heteroneurona (Figura 7 E y Figura 8). Además la presencia del antagonista del receptor de adenosina A1 CPT (5 μ M) no bloqueó el efecto sobre la probabilidad de liberación, observándose de nuevo un aumento ($n=13$; $p=0.006$) sin que se viera afectada la potencia sináptica ($n=13$; $p=0.57$) (Figura 7 E). Estos resultados sugieren que la movilización de eCBs aumenta los niveles de calcio astrocitarios lo que genera la liberación de ATP o adenosina desde los astrocitos la cual actúa en los receptores pre sinápticos de las sinapsis GABAérgicas provenientes de CeL, provocando un aumento en la probabilidad de liberación.

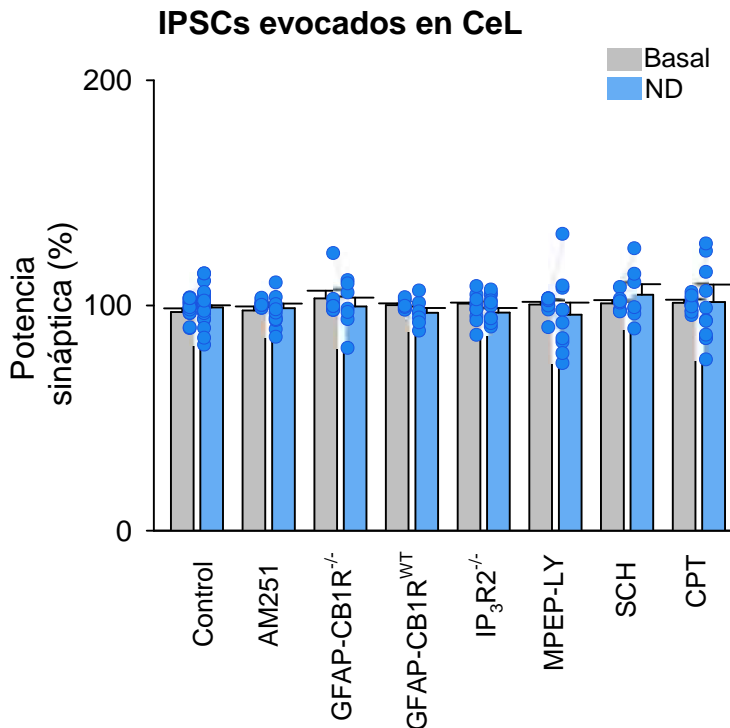


Figura 8: Efecto de la despolarización neuronal en la potencia de los IPSCs evocados en CeL. (A) Potencia sináptica los IPSCs evocados en CeL en condiciones basales y tras la despolarización neuronal en las distintas condiciones experimentales. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan la potencia sináptica y después de la despolarización neuronal en cada una de neuronas utilizadas para obtener los valores promedio.

Efecto de la actividad astrocitaria sobre las corrientes glutamatérgicas excitadoras.

Utilizando el protocolo de pares de registros, registramos dos neuronas de CeM y en la heteroneurona registramos EPSCs glutamatérgicos en la configuración de fallos y aciertos evocados por estimulación eléctrica en BLA (Figura 9). La despolarización neuronal generó una disminución en la probabilidad de liberación de los EPSCs evocados en BLA ($n=24$ neuronas; $p=0.004$) sin afectar a la potencia sináptica ($n=24$; $p=0.004$). Este cambio en la probabilidad de liberación sin afectar a la potencia sináptica sugiere un mecanismo de acción pre sináptico, apoyado por el cambio en la PPR de 0.98 ± 0.03 a 1.12 ± 0.04 ($n=12$; $p=0.001$). Para investigar si, como en la modulación de la transmisión sináptica de los IPSCs evocados en CeL, la modulación de la probabilidad de liberación de los EPSCs evocados en BLA depende de receptores CB1,

EPSCs evocados en BLA

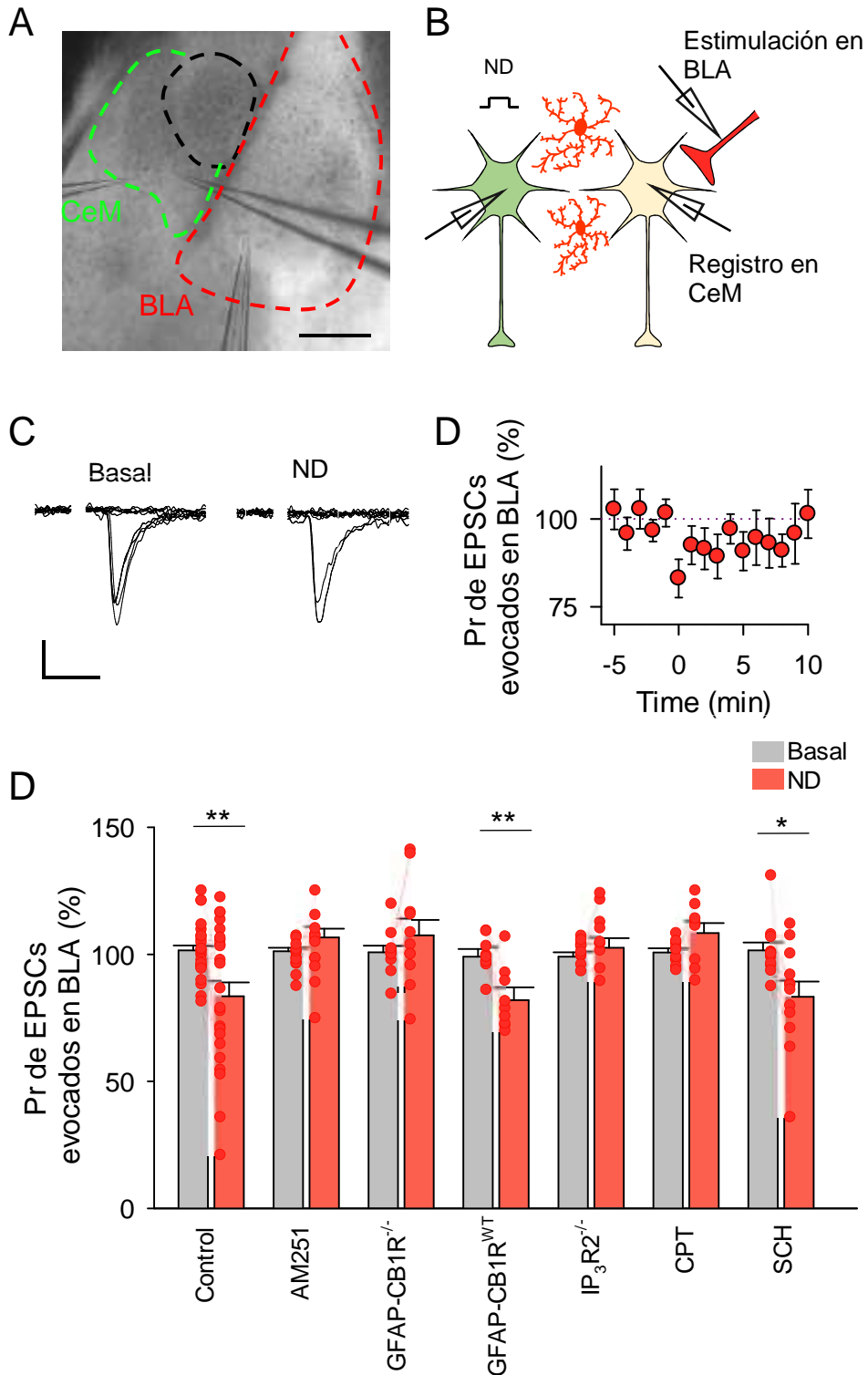


Figura 9: Efecto de la despolarización neuronal en los EPSCs evocados en BLA y registrados en la heteroneurona de CeM. **(A)** Imagen representativa de la condición experimental, representando las pipetas de registro en CeM (verde) y la pipeta de estimulación en BLA (Rojo). Barra de escala 250 μ m. **(B)** Representación esquemática de la condición experimental, heteroneurona en amarillo pálido, homoneurona en verde, astrocitos en rojo y la terminales pre sinápticas procedentes de BLA en rojo. **(C)** EPSCs evocados en BLA y registrados en la heteroneurona de CeM antes y después de la despolarización neuronal de la homoneurona. Barra de escala 10 pA y 25 ms. **(D)** Probabilidad de liberación de los EPSCs evocados en BLA y registrados en la heteroneurona de CeM, antes y después de la despolarización neuronal de la homoneurona de CeM. Cada punto representa la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. **(E)** Probabilidad de liberación de los EPSCs evocados en BLA en condiciones basales y tras la despolarización neuronal en las distintas condiciones experimentales. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan la probabilidad de liberación antes y después de la despolarización neuronal en cada una de neuronas utilizadas para obtener los valores promedio.

investigamos el efecto del antagonista de receptores CB1 AM251. En presencia de AM251 la despolarización neuronal no generó una disminución en la probabilidad de liberación ($n=12$; $p=0.66$), quedando de nuevo la potencia sin afectar (Figura 9 D y Figura 10). Este resultado de nuevo nos indica la implicación de los receptores CB1, pero para identificar si se trata de receptores CB1 astrocitarios o neuronales utilizamos el ratón transgénico CB1R^{-/-}, que carece de receptores CB1 en los astrocitos. En este modelo, la despolarización neuronal no generó un cambio en la probabilidad de liberación ($n=11$; $p=0.25$) ni en la potencia sináptica (Figura 9 D y Figura 10). En sus compañeros de camada GFAP-CB1^{WT} que no tenían la expresión del receptor de CB1 alterada pudimos observar una disminución en la probabilidad de liberación tras la despolarización neuronal ($n=9$; $p=0.003$) pero no un cambio en la potencia sináptica (Figura 9 D y Figura 10). Para elucidar si este efecto también depende de la señal de calcio procedente del retículo endoplásmico, utilizamos el ratón IP₃R2^{-/-}. En este modelo la despolarización neuronal no generó ningún efecto en la probabilidad de liberación ($n=10$ neuronas; $p=0.08$) ni en la potencia sináptica en la heteroneurona (Figura 9 D y Figura 10). En el caso de los IPSCs

evocados en CeL, la despolarización neuronal (utilizando el mismo protocolo) generaba la liberación de ATP o adenosina que actuaba en receptores pre sinápticos A2A. Por ello y como en este caso estamos viendo una disminución de la probabilidad de liberación y no un incremento, investigamos la posibilidad de que el efecto sobre los terminales glutamatérgicos estuviese mediado por el receptor de adenosina A1. Para ello repetimos el protocolo experimental en presencia del antagonista del receptor de adenosina A1 CPT. En presencia de CPT la despolarización neuronal no provocó ningún cambio en la probabilidad de liberación ($n=9$; $p=0.14$) ni en la potencia sináptica (Figura 9 D y Figura 10). En presencia del antagonista del receptor A2A, la despolarización neuronal sí generó una disminución en la probabilidad de liberación ($n=12$; $p=0.04$) sin afectar a la potencia sináptica (Figura 9 D y Figura 10). Estos resultados sugieren que la movilización de eCBs aumenta los niveles de calcio astrocitarios lo que genera la liberación de ATP o adenosina desde los astrocitos que actúa en los receptores pre sinápticos de adenosina A1 en las sinapsis glutamatérgicas provenientes de BLA provocando una disminución en la probabilidad de liberación. Así el mismo estímulo (la liberación de eCBs por las neuronas de CeM) generó en ambos casos la liberación de ATP o adenosina por los astrocitos de CeM, pero este genera un efecto opuesto en las sinapsis glutamatérgicas y GABAérgicas. Así la activación de los astrocitos generó un efecto diferencial sobre la excitación y la inhibición, aumentando la inhibición y disminuyendo la inhibición.

Efecto de la actividad astrocitaria sobre las corrientes GABAérgicas inhibitoras y las corrientes glutamatérgicas excitadoras sobre una misma neurona.

Los resultados anteriores muestran que la actividad de los astrocitos puede modular de manera diferencial las corrientes GABAérgicas y las corrientes glutamatérgicas. Los experimentos realizados para investigar el efecto de la actividad astrocitaria sobre estas corrientes están realizados en CeM registrando y despolarizando neuronas pertenecientes al mismo núcleo. Pero no podemos descartar la

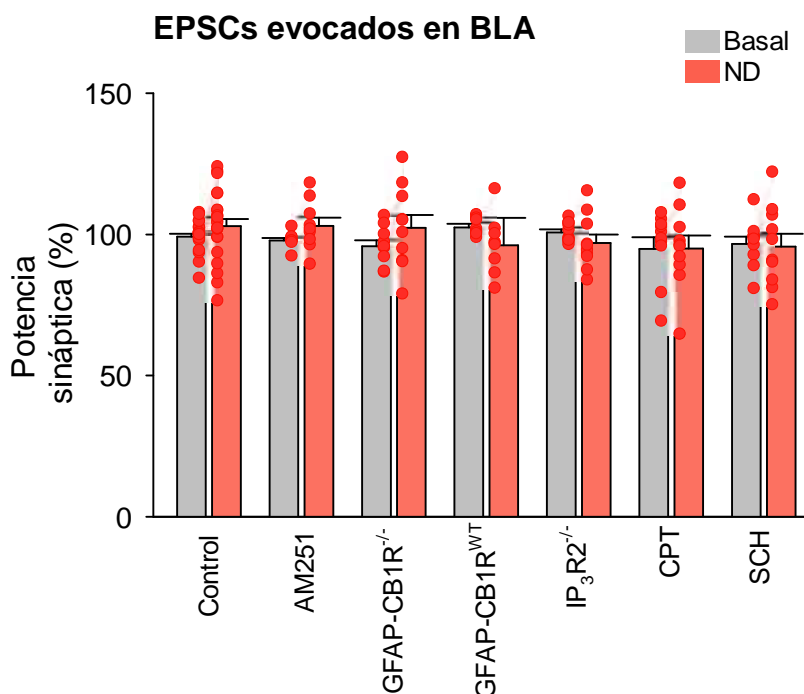


Figura 10: Efecto de la despolarización neuronal en la potencia de los EPSCs evocados en BLA. (A) Potencia sináptica los EPSCs evocados en BLA en condiciones basales y tras la despolarización neuronal en las distintas condiciones experimentales. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan la potencia sináptica y después de la despolarización neuronal en cada una de neuronas utilizadas para obtener los valores promedio.

posibilidad de que distintas poblaciones neuronales dentro de CeM se vean afectadas por cada uno de los distintos efectos reguladores. Así, cabe la posibilidad de que la potenciación de las sinapsis GABAérgicas no aparezca en las neuronas que experimentan la depresión de la sinapsis glutamatérgicas, y viceversa. Para investigar esta posibilidad recurrimos al protocolo de pares de registros, registrando IPSCs evocados en CeL y aislados farmacológicamente. Tras despolarizar la homoneurona y observar el efecto en la heteroneurona procedimos a cambiar la solución de perfusión, eliminando los antagonistas de los receptores de glutamato y aplicando antagonistas de los receptores de GABA. Tras esto procedimos a trasladar la pipeta de estimulación desde CeL hasta BLA, estimulando hasta que observamos corrientes glutamatérgicas estables (Figura 11). Una vez obtenidas las corrientes glutamatérgicas procedimos a despolarizar la homoneurona y a observar el efecto en la heteroneurona. Utilizando este protocolo observamos

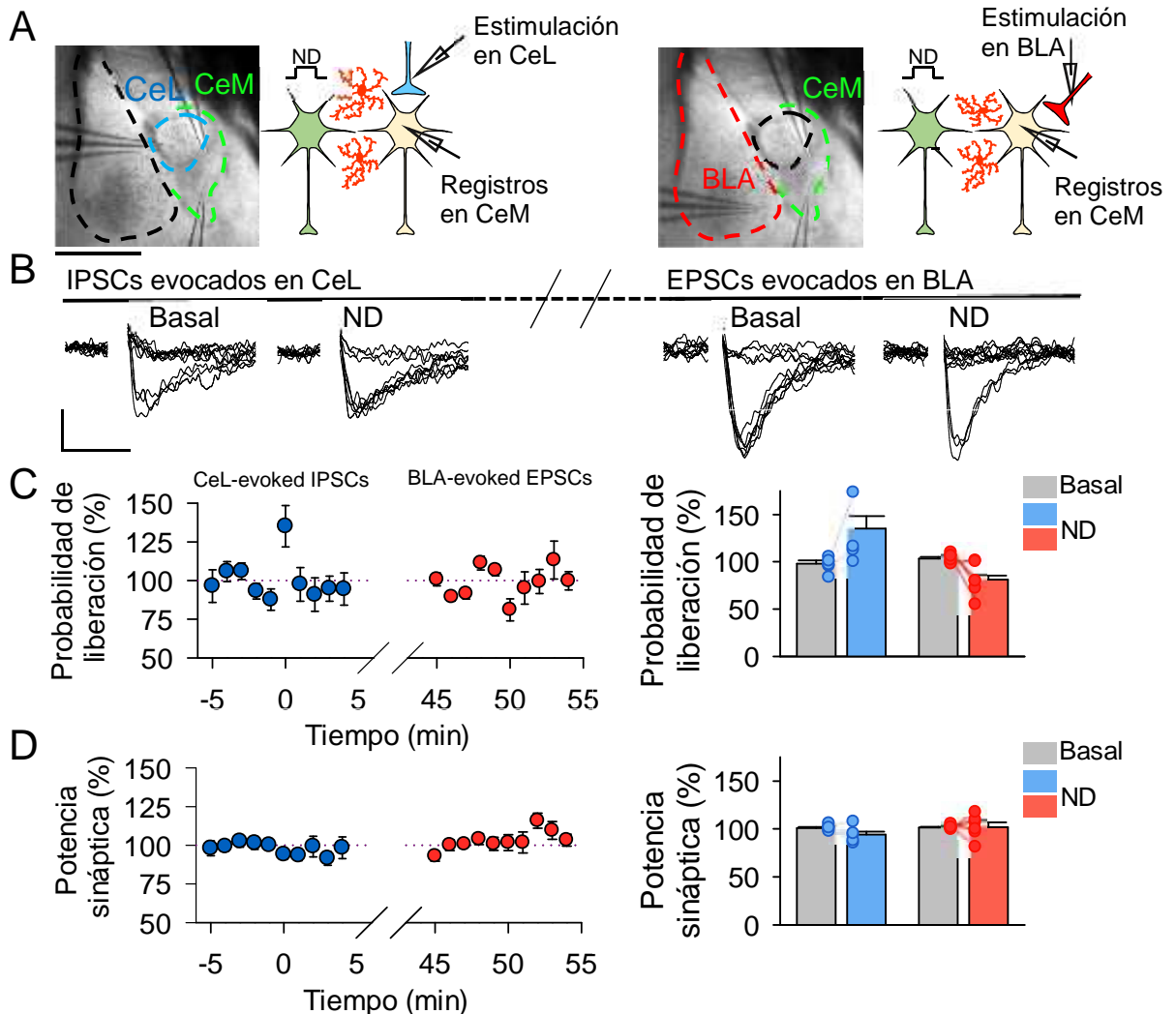


Figura 11: Efecto de la despolarización neuronal en los IPSCs evocados en CeL y los EPSCs evocados en BLA y registrados en la misma heteroneurona de CeM. (A) Imagen representativa y representación esquemática de la condición experimental, representando las pipetas de registro en CeM (verde) y la pipeta de estimulación en CeL (azul) y posteriormente en BLA (Rojo). Barra de escala 500 μ m (B) IPSCs evocados en CeL y EPSCs evocados en BLA y registrados en la misma heteroneurona de CeM antes y después de la despolarización neuronal de la homoneurona. (C) Probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL y EPSCs evocados en BLA y registrados en la misma heteroneurona de CeM, antes y después de la despolarización neuronal. Barras de escala 25 ms y 8 pA (D) Potencia sináptica de los IPSCs evocados en CeL y los EPSCs evocados en BLA en condiciones basales y tras la despolarización neuronal. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan la probabilidad de liberación antes y después de la despolarización neuronal en cada una de las neuronas utilizadas para obtener los valores promedio.

primero un aumento en la probabilidad de liberación en los IPSCs evocados en CeL ($n=6$; $p=0.02$) sin afectar a la potencia sináptica (Figura 11). Tras posicionar la pipeta de estimulación a BLA observamos una disminución en los EPSCs evocados en BLA ($n=6$; $p=0.04$) sin afectar a la potencia sináptica (Figura 11). Estos resultados demuestran que la activación de los astrocitos por eCBs puede modular la transmisión GABAérgica y glutamatérgica sobre una misma neurona de CeM.

Efecto de la aplicación de adenosina sobre las corrientes GABAérgicas inhibitoras y glutamatérgicas excitadoras.

Para estudiar si el efecto diferencial de la activación de los astrocitos se debe a la difusión pasiva del ATP o la adenosina liberada por los astrocitos y un patrón de expresión diferencial de receptores de adenosina A1 y A2A en los terminales pre sinápticos GABAérgicos y glutamatérgicos procedimos a aplicar adenosina mediante un pulso de presión. Dicha aplicación no generó aumentos de calcio en los astrocitos de CeM (Figura 12), por lo que podemos descartar un efecto derivado de la actividad de calcio astrocitaria.

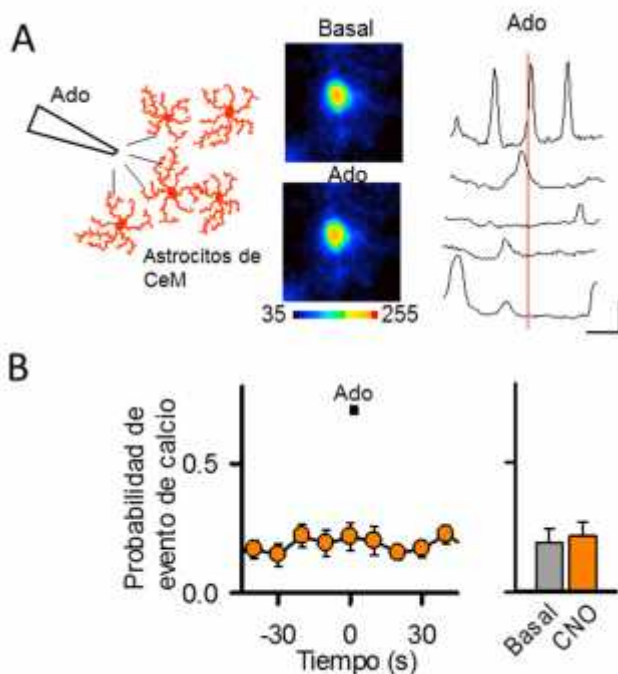


Figura 12: Respuesta de los astrocitos de CeM a la aplicación local de adenosina. (A) Izquierda: Representación esquemática de la condición experimental. Derecha: Imágenes en pseudocolor representativas de los niveles de calcio astrocitarios antes y después de la aplicación local de adenosina **(C)** Probabilidad de un evento de calcio en los astrocitos de CeM en condiciones basales y en respuesta a la aplicación de adenosina.

En cambio, los EPSCs evocados en BLA sufrieron un descenso en la Pr sin afectar a la potencia sináptica (Figura 13), efecto que no fue observado en presencia del agonista de receptores A1 CPT (Figura 13 B). Este efecto es consistente con el observado tras la activación astrocitaria y su posterior liberación de gliotransmisores.

A EPSCs evocados en BLA

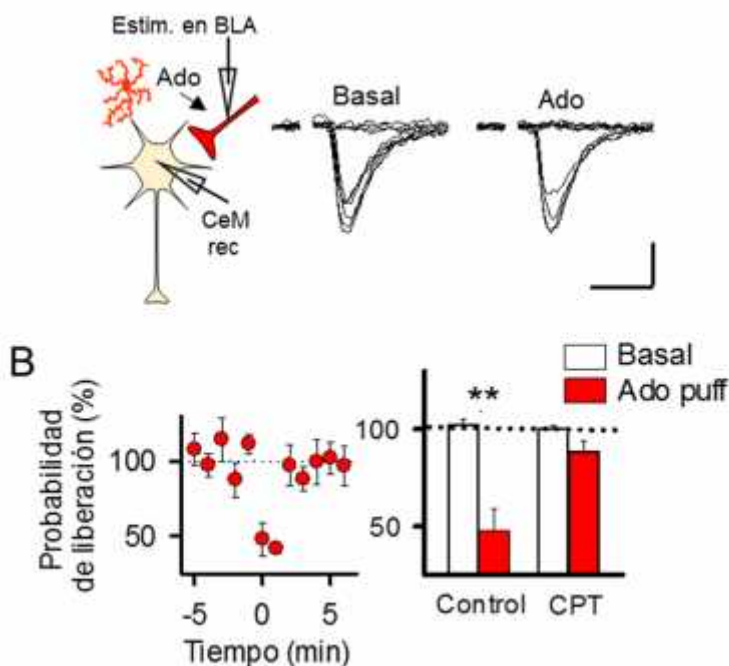


Figura 13: Efecto de la aplicación local de adenosina en los EPSCs evocados en BLA. (A) Representación esquemática de la condición experimental, neurona en amarillo pálido y la terminales pre sinápticas procedentes de BLA en rojo. EPSCs evocados en BLA y registrados en la heteroneurona de CeM antes y después de la aplicación de adenosina. Barra de escala 8 pA y 25 ms. (B) Probabilidad de liberación de los EPSCs evocados en BLA y registrados en CeM, antes y después de la aplicación local de adenosina

Cuando estudiamos los efectos de la aplicación de adenosina sobre los IPSCs evocados en CeL encontramos un efecto mucho más heterogéneo. En un 35% (6/17) de las sinapsis registradas observamos una disminución de la Pr, pero además en un 35% (6/17) observamos un aumento de la Pr (Figura 14). Además, observamos una disminución

en la potencia sináptica en un 70% de las sinapsis registradas (12/17). Para investigar las implicaciones de los distintos receptores sobre estos efectos utilizamos el antagonista de receptores A1 CPT. En presencia de CPT observamos un aumento de la Pr en un 50% de las sinapsis (5/10) y una disminución de la Pr en un 20% de ellas (2/10). La disminución en la potencia sináptica seguía aún presente en un 50% de las sinapsis (5/10). En presencia de SCH, antagonista de receptores A2A, observamos una depresión de la Pr en un 70% de las sinapsis (7/10) y no observamos una potenciación en ningún caso (0/10). Observamos además una disminución de la potencia sináptica en un 70% de los casos (7/10) (Figura 14). Estos resultados demuestran que los efectos de la aplicación directa de adenosina son más heterogéneos que los observados tras la activación astrocitaria, apareciendo efectos tanto pre sinápticos como post sinápticos, y estando involucrados tanto receptores A1 como A2A. Es por ello que los resultados obtenidos por la activación astrocitaria no pueden compararse con una aplicación no selectiva y global de adenosina, sugiriendo una acción más selectiva de la actividad astrocitaria sobre los receptores neuronales.

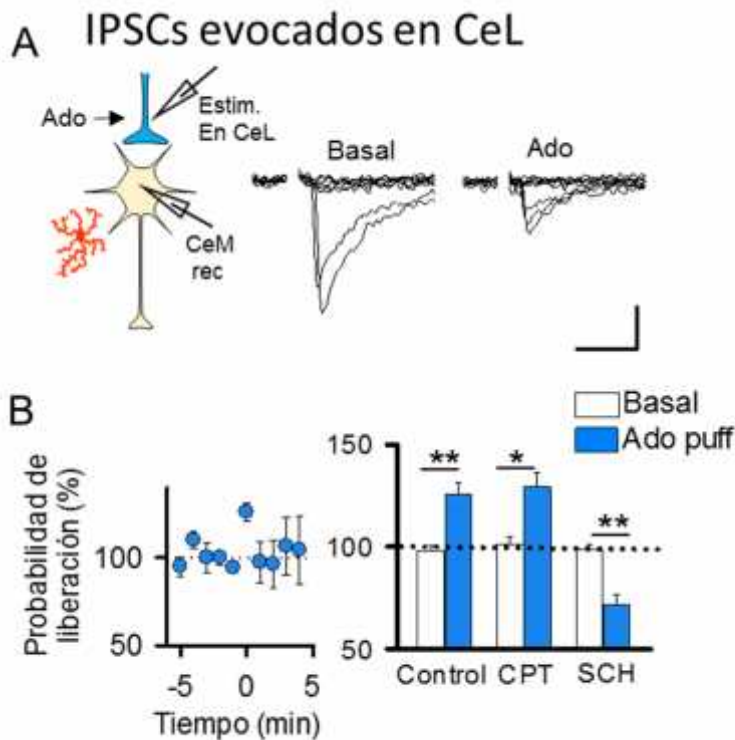


Figura 14: Efecto de la aplicación local de adenosina en los IPSCs evocados en CeL. (A) Representación esquemática de la condición experimental, neurona en amarillo pálido y la terminales pre sinápticas procedentes de CeL en azul. IPSCs evocados en CeL y registrados en CeM antes y después de la aplicación de adenosina. Barra de escala 8 pA y 25 ms. **(B)** Probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL y registrados en CeM, antes y después de la aplicación local de adenosina. En el histograma se representan los datos de las neuronas que aumentaron la Pr tanto en condiciones control como en CPT. En presencia de SCH ninguna neurona experimentó un aumento de la Pr, por lo que se representan todas las neuronas registradas.

2. Activación selectiva de astrocitos mediante quimiogenética.

Los resultados anteriores muestran el papel de los astrocitos en la regulación de la transmisión sináptica en CeM. Para estos resultados utilizamos un estímulo endógeno como es la liberación de eCBs por las propias células de CeM. Si bien este estímulo endógeno nos permite activar los astrocitos de una manera próxima a la cual estos se activarían en condiciones fisiológicas, este estímulo no nos permite la activación de los astrocitos in vivo de manera precisa y selectiva, pues aparecen receptores de CB1 otras poblaciones celulares. De manera que la activación de los astrocitos por eCBs no nos permite estudiar la función de la actividad de los astrocitos sobre la actividad de las neuronas de CeM in vivo ni nos permite estudiar como la activación de los astrocitos de CeM modifica los comportamientos relacionados con la actividad de este núcleo.

Es por ello que recurrimos al uso de la quimiogenética. Mediante el uso de vectores virales podemos expresar específicamente en astrocitos receptores acoplados a proteínas G que solo se activan por ligandos exógenos. Estos receptores se denominan DREADDs (del inglés *designed receptors specifically activated by designed drugs*). En particular en nuestro estudio utilizamos hM3D DREADDs los cuales están acoplados a proteínas Gq, y fueron transfectados mediante virus asociados con adenovirus de tipo 8 (AAV8); además la expresión de estos virus era dependiente de GFAP, para que se expresara específicamente en astrocitos. Por otra parte, para verificar la expresión del virus en astrocitos, el virus expresaba la proteína fluorescente mCherry.

De esta manera, mediante el uso de coordenadas estereotáficas, aplicamos el vector viral en CeM (Figura 15 A). Además, mediante técnicas inmunohistoquímicas confirmamos la expresión selectiva del virus en astrocitos, al observar que la proteína fluorescente mCherry co-localizaba con las células que expresaban GFAP (astrocitos) y no con la que expresaban NeuN (neuronas) (Figura 15 B). De esta manera podemos expresar este receptor selectivamente en los astrocitos de CeM, lo que nos permite estudiar el efecto de su activación selectiva tanto en el comportamiento sináptico, como en la actividad neuronal y sus comportamientos asociados.

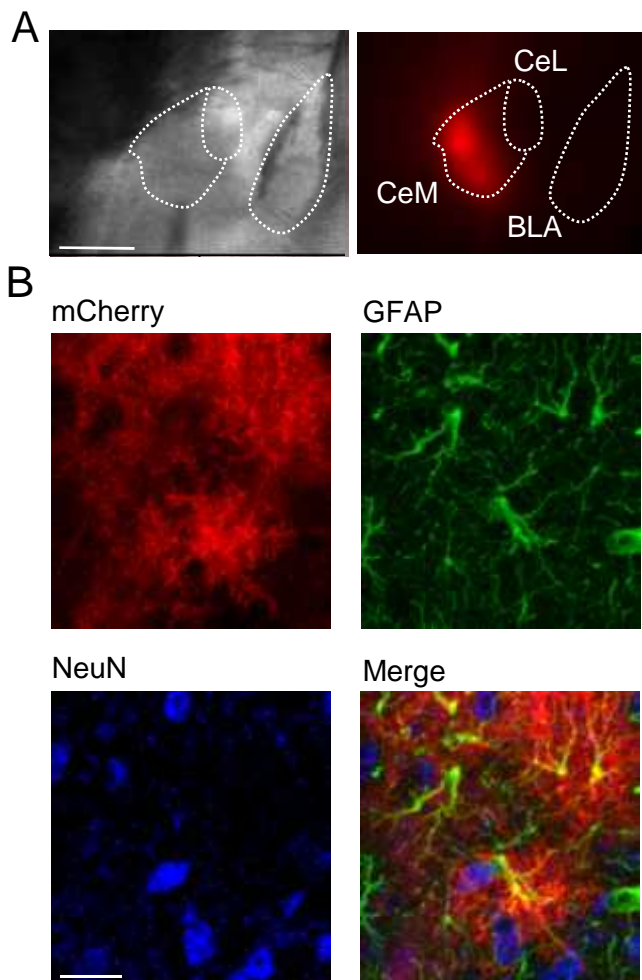


Figura 15: Localización de la expresión de los hM3D-DREADDs mediante la visualización de mCherry. (A) Imagen representativa que muestra la expresión de mCherry en la porción medial de la amígdala central (CeM). Barra escala 500 μm (B) Imágenes representativas de técnicas inmunohistoquímicas mostrando la expresión de mCherry (rojo) y su localización en astrocitos mediante el marcaje de GFAP (verde) y la falta de expresión en neuronas marcadas con NeuN (azul). Barra escala 20 μm .

Activación de DREADDs en los astrocitos y su influencia en la señal de calcio.

Para evaluar el efecto de la activación de los DREADDs en los astrocitos utilizamos el indicador de calcio fluorescente Fluo-4. Monitorizamos así la señal de calcio en astrocitos en los que confirmamos la expresión de los receptores DREADDs mediante la visualización de la proteína fluorescente mCherry. Para activar los receptores DREADDs utilizamos su ligando exógeno clozapine-N-oxide (CNO, 1mM). Aplicamos el CNO mediante una aplicación por presión (10 psi) durante 2 segundos. La aplicación del CNO generó un aumento en los niveles de calcio intracelulares (Figura 16 A y B),

cuantificados como un aumento en la probabilidad de eventos de calcio ($n=78$ astrocitos, $n=7$ rodajas, $p=0.0018$) (Figura 16 C). Así la activación selectiva de astrocitos mediante DREADDs permite activarlos de manera específica, incrementando los niveles de calcio intracelulares de manera transitoria y similar a lo ocurrida tras el estímulo endógeno (eCBs).

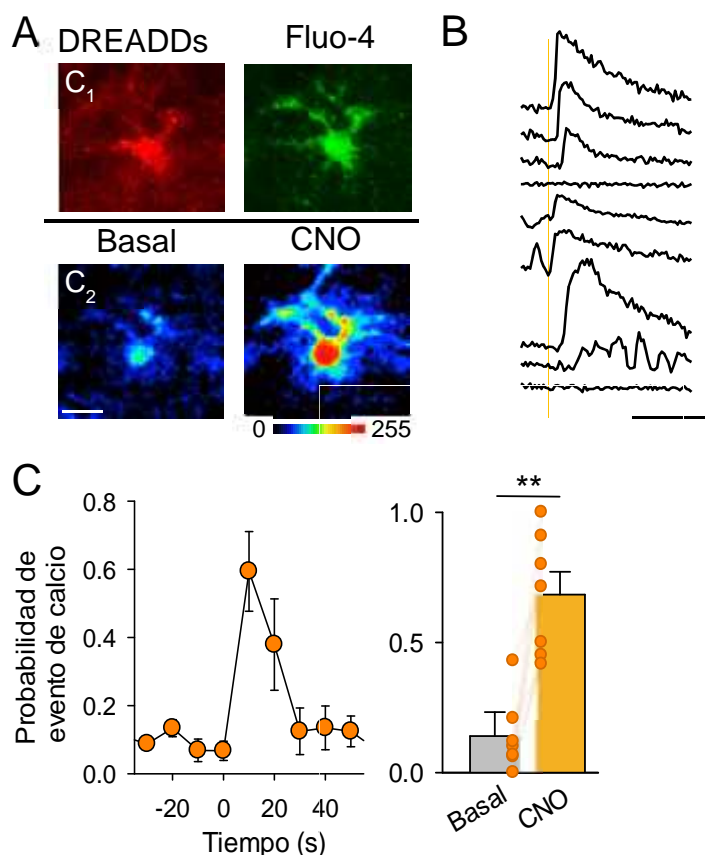


Figura 16: Respuesta de los astrocitos de CeM que expresan DREADDs a la aplicación local del agonista CNO. (A) Arriba: Imagen representativa de la expresión de DREADDs mediante mCherry en un astrocito de CeM y su marcaje con el indicador de calcio Fluo-4. Abajo: Niveles de calcio medidos con el indicador Fluo-4, antes y después de la aplicación local de CNO. Derecha: Imágenes en pseudocolor representativas de los niveles de calcio astrocitarios antes y después de la aplicación local de CNO. Barra escala 5 μ m. (B) Trazos representativos de los niveles de calcio de los astrocitos de una rodaja tras la aplicación de CNO marcada con la línea naranja). Barra de escala 50 % y 30 s (C) Probabilidad de un evento de calcio en los astrocitos de CeM en condiciones basales y en respuesta a la aplicación de CNO.

Efecto de la activación selectiva de astrocitos en la transmisión sináptica GABAérgica procedente de CeL y en la transmisión sináptica glutamatérgica procedente de BLA.

Si el efecto de la activación de astrocitos mediante eCBs sobre la transmisión sináptica es un efecto general este podría reproducirse mediante la activación de astrocitos por otros métodos. Así, investigamos si la activación de astrocitos mediante DREADDs puede reproducir los efectos producidos por la activación de los astrocitos por eCBs, un estímulo endógeno.

En los animales previamente transfectados con DREADDs registramos neuronas de CeM, en áreas donde la expresión de los DREADDs se confirmó mediante la visualización de la proteína fluorescente mCherry. La aplicación de CNO mediante pulsos de presión originó un aumento en la probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL ($n=7$; $p=0.004$) sin afectar a la potencia sináptica ($n=7$; $p=0.83$) (Figura 17 y Figura 19). Este aumento de la probabilidad de liberación no se observó cuando la aplicación de CNO se realizó en presencia del antagonista de los receptores de adenosina A2A ($n=7$, $p=0.96$), situación en la que tampoco se vio afectada la potencia sináptica (Figura 17 y Figura 19). Estos resultados sugieren que la activación mediante DREADDs de los astrocitos genera en la transmisión sináptica un efecto similar al de la activación astrocitaria mediante eCBS. Por ello investigamos si esta reproducibilidad del estímulo endógeno mediante un estímulo exógeno también se produce en el efecto producido por los astrocitos en las sinapsis glutamatérgicas provenientes de BLA. Para ello evocamos EPSCs mediante estimulación en BLA y tras la aplicación de CNO por pulsos de presión observamos una depresión en la probabilidad de liberación ($n=8$; $p=0.02$) sin afectar a la potencia sináptica ($n=8$; $p=0.2$) (Figura 18 y Figura 19). Este efecto se vio abolido cuando el CNO se aplicó en presencia del antagonista de los receptores de adenosina A1 CPT ($n=7$; $p=0.3$), situación en la que la potencia sináptica tampoco se vio afectada (Figura 18 y Figura 19).

IPSCs evocados en CeL

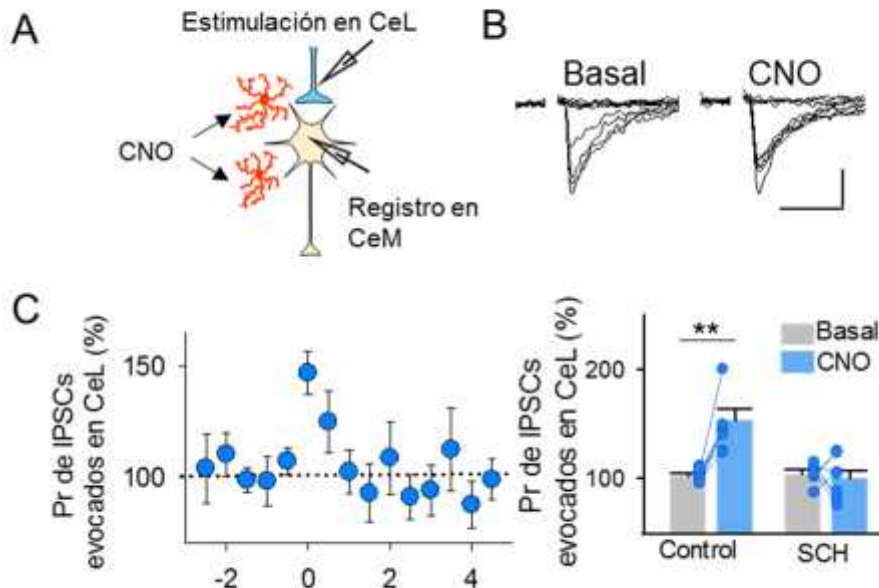


Figura 17: Efecto de la aplicación local de CNO en los IPSCs evocados en CeL. **(A)** Representación esquemática de la condición experimental, neurona en amarillo pálido y la terminales pre sinápticas procedentes de CeL en azul. **(B)** IPSCs evocados en CeL y registrados en CeM antes y después de la aplicación de CNO en rodajas en las que la expresión de DREADDs fue confirmada mediante la visualización de mCherry. Barra de escala 10 pA y 25 ms. **(C)** Izquierda: Probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL y registrados en CeM, antes y después de la aplicación local de CNO Derecha: Probabilidad de liberación basal y tras la aplicación de CNO en situaciones control y en presencia de SCH, el antagonista de los receptores de adenosina A2A.

Estos resultados demuestran que la activación de los astrocitos mediante Gq DREADDs no solo provoca aumentos de calcio intracelulares sino que además induce la liberación del gliotransmisor ATP y efectos corriente abajo sobre la transmisión sináptica. Estos efectos sobre la transmisión sináptica son comparables a los observados tras la activación astrocitaria mediante un agonista endógenos (eCBs). Así, estos resultados no solo demuestran que la actividad astrocitaria es suficiente para inducir la modulación diferencial

sobre la transmisión sináptica, sino además que la activación astrocitaria mediante DREADDs es capaz de reproducir los efectos observados tras la activación astrocitaria mediante estímulos endógenos.

EPSCs evocados en BLA

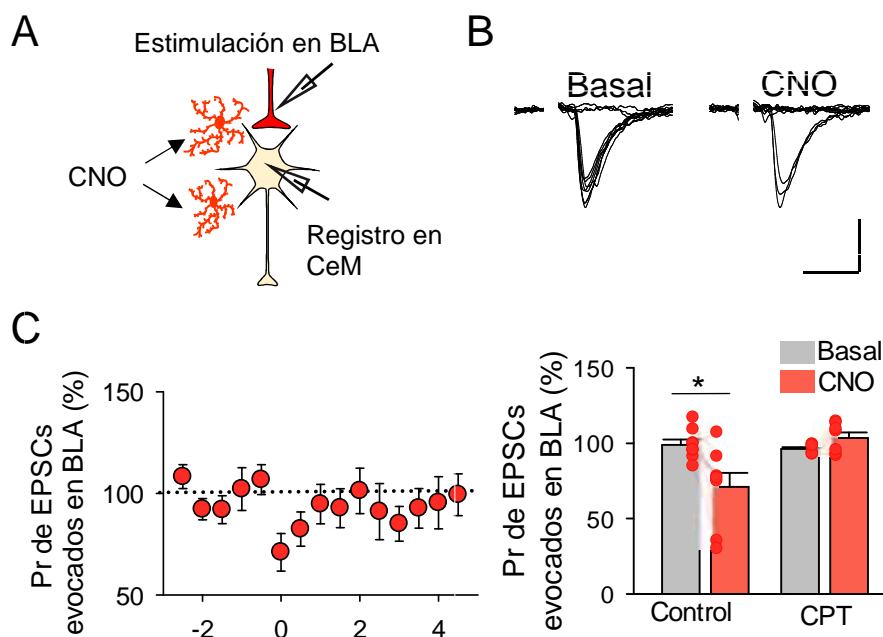


Figura 18: Efecto de la aplicación local de CNO en los EPSCs evocados en BLA. (A) Representación esquemática de la condición experimental, neurona en amarillo pálido y la terminales pre sinápticas procedentes de BLA en rojo. (B) EPSCs evocados en BLA y registrados en CeM antes y después de la aplicación de CNO en rodajas en las que la expresión de DREADDs fue confirmada mediante la visualización de mCherry. Barra de escala 20 pA y 25 ms. (C) Izquierda: Probabilidad de liberación de los EPSCs evocados en BLA y registrados en CeM, antes y después de la aplicación local de CNO Derecha: Probabilidad de liberación basal y tras la aplicación de CNO en situaciones control y en presencia de CPT, el antagonista de los receptores de adenosina A1.

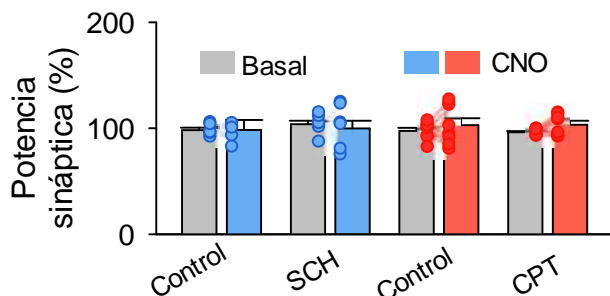


Figura 19: Efecto de la aplicación de CNO sobre la potencia sináptica de los IPSCs evocados en CeL y de los EPSCs evocados en BLA. *Potencia sináptica los IPSCs evocados en CeL y los EPSCs evocados en BLA en condiciones basales (gris) y tras la aplicación de CNO (azul para los IPSCs y rojo para los EPSCs), en condiciones basales y en presencia del SCH, agonista de los receptores de adenosina A2A y CPT agonista de los receptores de adenosina A1. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan cada una de neuronas utilizadas para obtener los valores promedio.*

Efecto de la aplicación continuada de CNO sobre la señal de calcio astrocitaria.

En los resultados anteriores demostramos que la aplicación transitoria del agonista de los DREADDs, el CNO, es capaz de incrementar los niveles de calcio intracelular. Si bien estos resultados sientan las bases para la utilización de este agonista para la activación de astrocitos in vivo, en estos protocolos experimentales la aplicación de CNO no puede controlarse de manera temporal tan precisa. Es por ello que decidimos estudiar el comportamiento de la señal de calcio astrocitaria tras la aplicación continuada de CNO. Así en estos experimentos sustituimos la aplicación local del agonista por su aplicación en el sistema de perfusión.

Para observar el efecto de la aplicación persistente de CNO en la actividad de calcio astrocitaria utilizamos el indicador fluorescente de calcio en rodajas de cerebro de ratones previamente transfectados con

DREADDs. Tras aplicar CNO en la solución de perfusión medimos los niveles de calcio astrocitario mediante Fluo-4 en astrocitos que expresan DREADDs, (Figura 20 A). Así, durante la aplicación continuada de CNO en rodajas que expresan DREADDs observamos un aumento en los niveles de calcio en los astrocitos de CeM (Figura 20 A y B) cuantificada como un aumento en la frecuencia de los eventos de calcio (n=74 astrocitos; n=6 rodajas; p=0.009) (Figura 20 C).

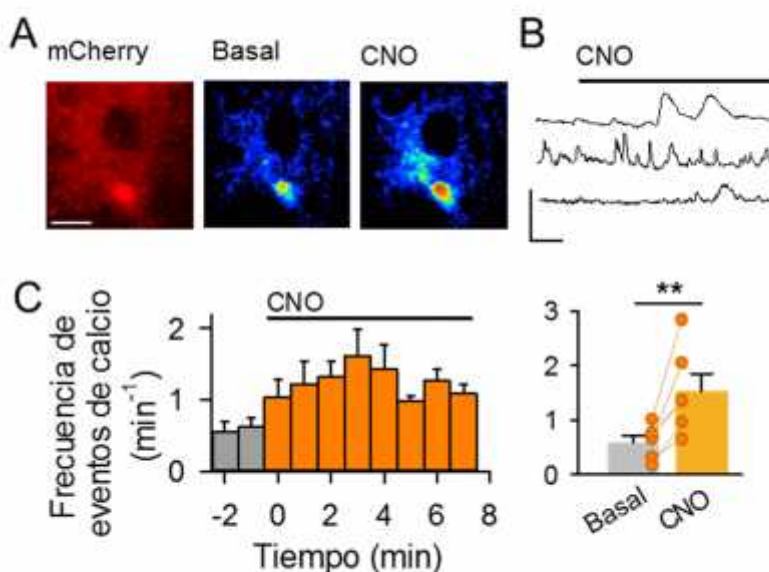


Figura 20: Respuesta de los astrocitos de CeM que expresan DREADDs a la aplicación continuada del agonista CNO. (A) *Imagen representativa de la expresión de DREADDs mediante mCherry en un astrocito de CeM y sus niveles de calcio medidos con el indicador Fluo-4, antes y después de la aplicación de CNO. Barra escala 10 μ m. (B)* *Trazos representativos de los niveles de calcio de los astrocitos de una rodaja en condiciones basales y durante la aplicación de CNO. Barra de escala 45 % y 60 s (C)* *Frecuencia de eventos de calcio en los astrocitos de CeM en condiciones basales y durante la aplicación de CNO.*

Efecto de la activación persistente de los astrocitos sobre la transmisión sináptica en CeM.

La aplicación de CNO de manera transitoria en rodajas transfectadas con DREADDs específicamente en astrocitos de CeM genera efectos tanto en la señal de calcio astrocitaria como en la transmisión sináptica sobre las neuronas de CeM. Para estudiar si la aplicación continuada de CNO además de generar un aumento en la frecuencia de eventos de calcio también genera alteraciones en la transmisión sináptica registramos neuronas de CeM y registramos primero IPSCs evocados mediante estimulación eléctrica en CeL. Registramos la transmisión sináptica a nivel basal tras lo que procedimos a la perfusión de CNO. En estas condiciones observamos un aumento continuado de la probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL ($n=9$; $p=0.001$) sin afectar a la potencia sináptica (Figura 21 y Figura 23). Este efecto se revirtió por la aplicación del antagonista de los receptores A2A SCH ($n=7$, $p=0.96$) (Figura 21 C y Figura 23).

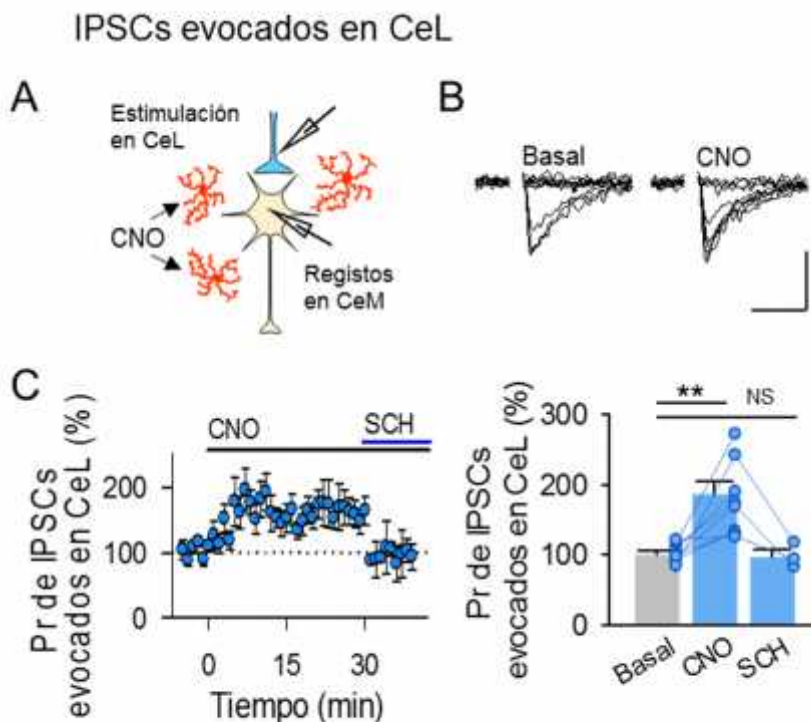


Figura 21: Efecto de la aplicación continuada de CNO en los IPSCs evocados en CeL. **(A)** Representación esquemática de la condición experimental, neurona en amarillo pálido y la terminales pre sinápticas procedentes de CeL en azul. **(B)** IPSCs evocados en CeL y registrados en CeM antes y durante la aplicación de CNO en rodajas en las que la expresión de DREADDs fue confirmada mediante la visualización de mCherry. Barra de escala 15 pA y 25 ms. **(C)** Izquierda: Probabilidad de liberación de los IPSCs evocados en CeL y registrados en CeM, antes y durante la aplicación continuada de CNO. Derecha: Probabilidad de liberación basal, durante la aplicación de CNO y tras aplicar SCH, el antagonista de los receptores de adenosina A2A.

Cuando investigamos la transmisión sináptica glutamatérgica evocada en BLA observamos que la aplicación continuada de CNO generó una disminución en la probabilidad de liberación ($n=8$; $p=0.02$) sin afectar a la potencia sináptica (Figura 22 y Figura 23). Este efecto se revirtió por la aplicación del antagonista de los receptores A1 CPT ($n=7$; $p=0.3$) (Figura 22 y Figura 23). Estos resultados indican que la aplicación continuada no solo genera un aumento sostenido en el número de eventos de calcio en los astrocitos, sino que además el efecto corriente debajo de la activación astrocitaria también aparece de manera tónica durante la aplicación continuada de CNO, agonista de los DREADDs, lo cual nos indica que la activación astrocitaria continuada genera un efecto continuo en la actividad neuronal, lo cual nos permite investigar este efecto tanto en registros in vivo como en protocolos de comportamiento.

EPSCs evocados en BLA

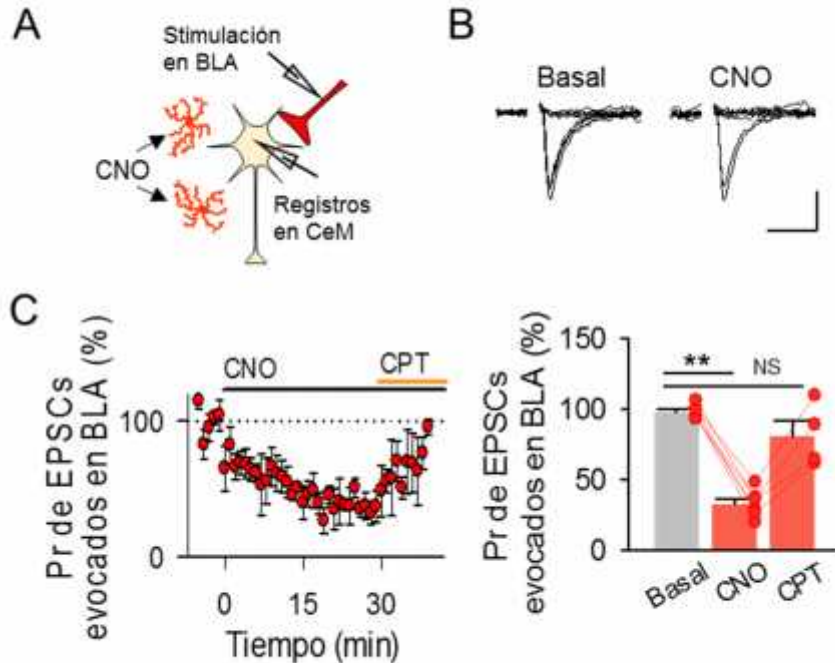


Figura 22: Efecto de la aplicación continuada de CNO en los EPSCs evocados en CeL. **(A)** Representación esquemática de la condición experimental, neurona en amarillo pálido y la terminales pre sinápticas procedentes de BLA en rojo. **(B)** EPSCs evocados en BLA y registrados en CeM antes y durante la aplicación de CNO en rodajas en las que la expresión de DREADDs fue confirmada mediante la visualización de mCherry. Barra de escala 15 pA y 25 ms. **(C)** Izquierda: Probabilidad de liberación de los EPSCs evocados en BLA y registrados en CeM, antes y durante la aplicación continuada de CNO Derecha: Probabilidad de liberación basal, durante la aplicación de CNO y tras aplicar CPT, el antagonista de los receptores de adenosina A1.

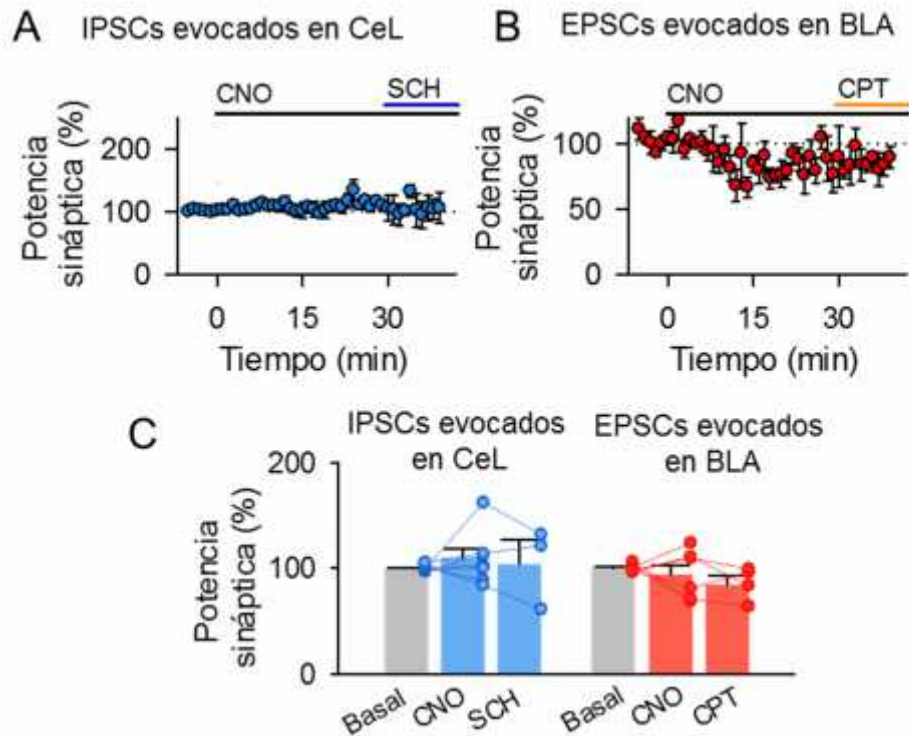


Figura 23: Efecto de la aplicación continuada de CNO sobre la potencia sináptica de los IPSCs evocados en CeL y de los EPSCs evocados en BLA. (A) *Potencia sináptica los IPSCs evocados en CeL durante la aplicación de CNO y posteriormente tras la aplicación de SCH. (B)* *Potencia sináptica los EPSCs evocados en BLA durante la aplicación de CNO y posteriormente tras la aplicación de CPT. (C)* *Potencia sináptica los IPSCs evocados en CeL y los EPSCs evocados en CeL y los EPSCs evocados en BLA en condiciones basales (gris) y durante la aplicación de CNO (azul para los IPSCs y rojo para los EPSCs), y tras la aplicación de SCH, agonista de los receptores de adenosina A2A y CPT agonista de los receptores de adenosina A1. Los histogramas representan la media y la barra de error representa el error estándar de la medida. Cada par de puntos representan cada una de neuronas utilizadas para obtener los valores promedio.*

3. Consecuencias de la activación de astrocitos de CeM in vivo.

Basándonos en los resultados obtenidos ex vivo investigamos el efecto de la actividad astrocitaria in vivo. Para ello utilizamos por un lado ratones en los que la expresión génica ha sido alterada y por otro lado ratones en los que transfectamos astrocitos de CeM para inducir su activación de manera selectiva y temporalmente controlada. Basándonos en los efectos observados ex vivo esperamos observar un efecto en el ratio de disparo de las neuronas de CeM cuando activamos los DREADDs expresados en los astrocitos de CeM. Además de la activación de la actividad de neuronal en CeM podríamos esperar observar un efecto en el comportamiento derivado de la actividad de este núcleo. Por otro lado, en los modelos transgénicos donde la actividad astrocitaria está alterada, podríamos observar un efecto en el comportamiento, si bien este efecto no se puede atribuir completamente a la actividad astrocitaria en CeM, aunque sea el principal *output* de la amígdala encargado de la expresión del miedo condicionado, pues la actividad de astrocitos de otras regiones cerebrales también se encuentra alterada en estas líneas.

Efecto de la activación de Gq DREADDs en astrocitos sobre la frecuencia de disparo de las neuronas de CeM.

Para investigar el efecto de la activación astrocitaria sobre la actividad neuronal de las neuronas de CeM realizamos registros electrofisiológicos in vivo. Para ello anestesiamos con uretano (1.8 g/Kg) animales previamente transfectados con DREADDs. A continuación colocamos de manera estereotáxicamente controlada un electrodo de registro de actividad multi unidad en CeM. De esta manera obtuvimos registros de la frecuencia de disparo basal de las neuronas de CeM (durante 30 minutos) para después aplicar de manera intraperitoneal bien CNO (2mg/Kg) o bien solución salina. Tras aplicar CNO observamos una disminución en la frecuencia de disparo de las neuronas de CeM (n=28 neuronas de 7 ratones, p=0.004) (Figura 24). Este descenso en la frecuencia de disparo no se observó tras aplicar solución salina (n=23 neuronas de 6 ratones, p=0.6) (Figura 24 D). Estos resultados demuestran que la activación de los astrocitos de CeM mediante métodos quimiogénéticos produce una disminución en la actividad neuronal. Este resultado es consistente con la modulación

diferencial de las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas observada ex vivo.

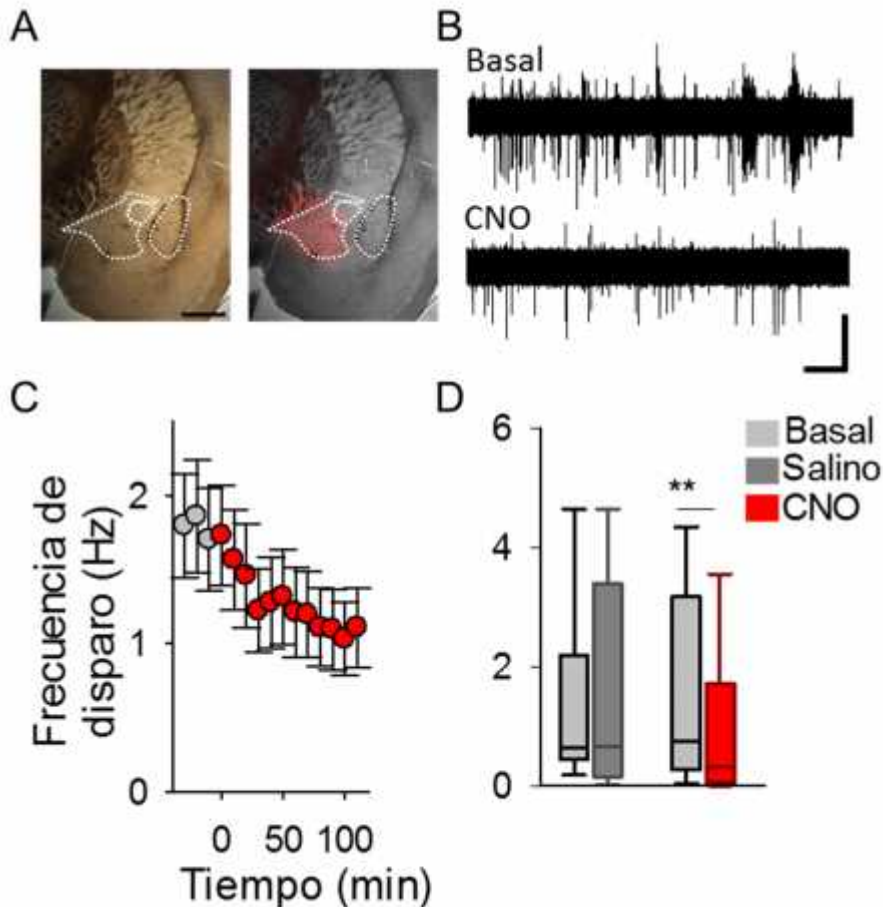


Figura 24: Efecto de la aplicación activación de astrocitos de CeM sobre la frecuencia de disparo de las neuronas de CeM. (A) Imagen representativa de la localización de los DREADDs mediante la visualización de mCherry. Barra de escala 500 μm . **(B)** Registros multi unidad representativos de la actividad neuronal en CeM antes y después de la aplicación de CNO. Barra de escala 50 μV y 60 s. **(C)** Frecuencia de disparo de las neuronas de CeM en condiciones basales (gris) y después de la aplicación de CNO (rojo). **(D)** Frecuencia de disparo de las neuronas de CeM en condiciones basales (gris pálido) y tras la aplicación de solución salina (gris oscuro) o CNO (rojo). Los datos se representan en box-wisker plots, representando la mediana, el rango inter-cuartil y los percentiles 90 y 10 de la distribución de los datos.

Estudio del efecto de la activación de Gq DREADDs en astrocitos sobre el miedo condicionado.

Las expresiones de distintos comportamientos son el resultado de la actividad neuronal de distintas áreas cerebrales. Esta actividad neuronal es en última instancia controlada por la actividad sináptica excitadora e inhibidora. Los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *ex vivo* demuestran que los astrocitos de CeM son capaces de modular la actividad sináptica y neuronal en CeM. Para investigar el rol de la actividad astrocitaria en CeM utilizamos ratones en los que expresamos Gq DREADDs específicamente en astrocitos de CeM. Utilizamos un protocolo de miedo condicionado para el estudio del efecto de la actividad de los astrocitos de CeM en comportamientos asociados a la actividad de CeM. Así los animales previamente transfectados con Gq DREADDs fueron sometidos a un proceso de aprendizaje del miedo, en el que un estímulo no condicionado (ligero shock eléctrico) fue pareado con un estímulo condicionado (un tono de 80 db y la presentación simultánea de luz). Este entrenamiento consistió en 5 presentaciones pareadas de estímulos en los que observamos como respuesta un aumento en la expresión del *freezing* como medida del miedo condicionado (Figura 25 A). 24 horas después del condicionamiento procedimos al test de la expresión del miedo condicionado. 30 minutos antes de la presentación del estímulo condicionado procedimos a la inyección intraperitoneal de CNO o de salino. Este estímulo fue presentado en condiciones contextuales alteradas, para asegurarnos de que el miedo condicionado se producía en respuesta al estímulo y no al contexto. Por ello, en el test de la expresión del miedo se modificaron tanto las señales visuales como el suelo y el olor con respecto al aprendizaje del miedo condicionado. Tras la presentación del estímulo condicionado observamos la expresión de miedo medida como *freezing*. En los animales inyectados intraperitonealmente con CNO (n=33) observamos un descenso en la expresión del miedo, comparado con los animales inyectados con salino (n=30) en los 3 minutos posteriores a la presentación del estímulo condicionado ($p=0.037$; $p<0.001$, $p<0.001$ respectivamente) (Figura 25 B). No solo observamos una disminución de la expresión del miedo condicionado sino que además observamos una clara extinción del miedo en los minutos posteriores a la presentación del estímulo condicionado en los animales inyectados con CNO que no está presente en los animales

inyectados con salino (Figura 25 B). 24 horas después del primer test de la expresión del miedo condicionado volvimos a someter a los animales al estímulo condicionado para cuantificar la expresión del miedo. Esta vez los animales no fueron previamente inyectados ni con CNO ni con salino. No observamos diferencias en la expresión del miedo condicionado entre los animales que el día anterior fueron inyectados con CNO y salino ($p=0.23$; $p=0.24$; $p=0.066$) (Figura 25 B). Así, la activación de los astrocitos genera un efecto en la expresión del miedo condicionado a corto plazo, no observable a las 24 horas de la aplicación de CNO, sugiriendo que la activación de astrocitos de CeM genera una modificación en la expresión del miedo condicionado sin generar efectos de plasticidad a largo plazo. Este resultado es consistente con el efecto transitorio en la actividad sináptica observable tras la activación astrocitaria ex vivo.

Para determinar si el efecto producido en el condicionamiento del miedo tras la activación de los astrocitos es específico de este proceso o es una modulación global del comportamiento, realizamos un test de ansiedad, el laberinto elevado en forma de cruz o *elevated plus maze* (EPM). En este test de comportamiento inyectamos CNO o salino en animales inyectados con DREADDs. En este test aparecen brazos abiertos y cerrados. Para los ratones los brazos abiertos son más ansiogénicos que los brazos cerrados, de modo que estos prefieren estar la mayoría del tiempo en los brazos cerrados. El porcentaje del tiempo que los ratones estuvieron en los brazos abiertos nos indica el nivel de ansiedad. La activación de los astrocitos de CeM con CNO no originó ningún efecto en el porcentaje del tiempo en los brazos abiertos ($p=0.29$) (Figura 25 C), lo que indica que la activación de los astrocitos de CeM no genera modificaciones en el comportamiento de la ansiedad. Este resultado sugiere que la actividad de los astrocitos de CeM está específicamente relacionada con la expresión del miedo condicionado y no con estados emocionales más globales como la ansiedad.

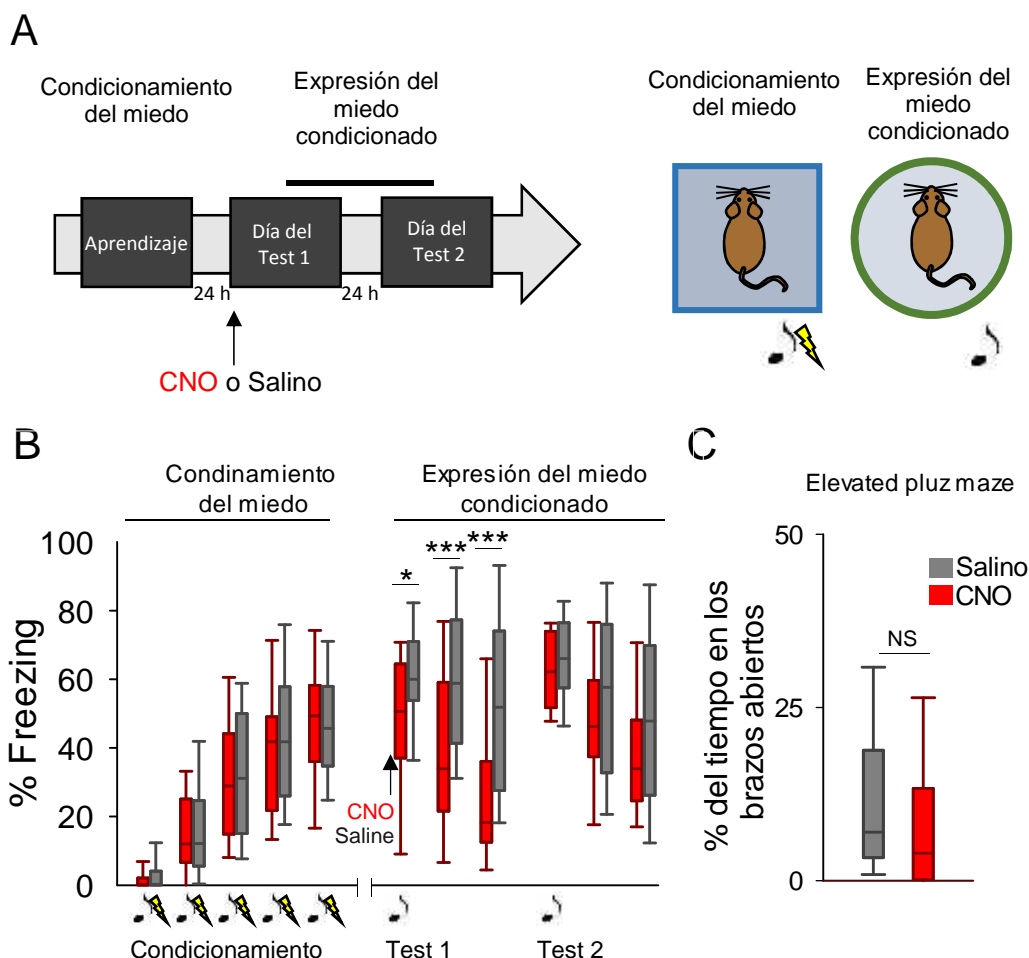


Figura 25: Efecto de la aplicación activación de astrocitos de CeM sobre los comportamientos asociados al miedo condicionado. (A) Esquema del protocolo experimental. Los ratones son sometidos al condicionamiento del miedo y tras 24 horas son expuestos al estímulo condicionado en un ambiente alterado. 30 minutos antes de la presentación del estímulo condicionado se inyecta de manera intra peritoneal bien CNO o salino. 24 horas después de la primera exposición al estímulo condicionado este se vuelve a presentar, esta vez sin previa aplicación de CNO a salino. **(B)** Porcentaje del tiempo que se observa freezing en el animal durante el condicionamiento y tras la aplicación del estímulo condicionado. **(C)** Porcentaje del tiempo que el animal paso en los brazos abiertos en el elevated plus maze. Los datos se representan en box-wisker plots, representando la mediana, el rango inter-cuartil y los percentiles 90 y 10 de la distribución de los datos.

Efecto de la deficiencia en la señal de calcio astrocitaria en el condicionamiento del miedo.

En los resultados anteriores mostramos como la activación de la señal de calcio astrocitaria mediante DREADDs produce un efecto de reducción en la expresión del miedo condicionado. Si bien este resultado demuestra que los astrocitos de CeM tienen la capacidad de generar un cambio en la expresión del miedo condicionado, estos resultados no demuestran que su actividad sea necesaria para la correcta expresión del mismo. Para explorar esta posibilidad utilizamos el modelo genético del ratón $IP_3R2^{-/-}$, en el que la señal de calcio en los astrocitos es deficiente (ver figura 5 D). De manera consistente con los resultados anteriores, en este modelo no observamos ninguna diferencia durante el proceso de condicionamiento del miedo (Figura 26 A), pero si un aumento en la expresión del miedo condicionado el día posterior tras la expresión del estímulo condicionado, cuando comparamos los ratones $IP_3R2^{-/-}$ con los ratones IP_3R2^{WT} (Figura 26 A). Dos días después del proceso de condicionamiento del miedo, tras aplicar el estímulo condicionado solo observamos una diferencia en el primer minuto posterior a la presentación del estímulo, pero no en los minutos siguientes (Figura 26 A). No obstante, estos resultados han de interpretarse con cautela, pues se trata de un modelo en el que la deficiencia en el receptor de IP_3 de tipo 2 es global (no está restringida a los astrocitos de CeM) y cuya depleción constitutiva puede ocasionar alteraciones durante el desarrollo; sin embargo, los resultados obtenidos son consistentes con el efecto observado tras la activación de los astrocitos de CeM mediante DREADDs, y nos indican que no solo el aumento de la actividad astrocitaria sino también la disminución de la actividad astrocitaria afectan a la expresión del miedo condicionado.

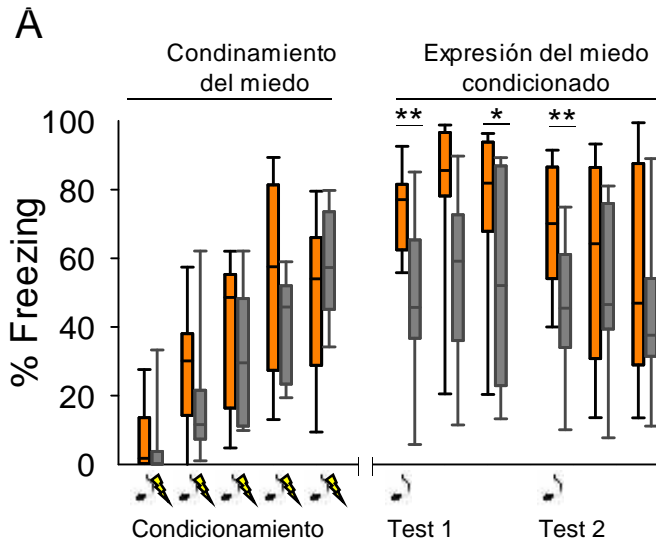


Figura 26: Efecto de la deficiencia de la señal de calcio astrocitaria sobre los comportamientos asociados al miedo condicionado. (A) Porcentaje del tiempo que se observa freezing en el animal durante el condicionamiento y tras la aplicación del estímulo condicionado. En naranja se presentan los datos obtenidos en los ratones IP3R2^{-/-} y en gris los datos obtenidos en el grupo control. Los datos se representan en box-wisker plots, representando la mediana, el rango inter-cuartil y los percentiles 90 y 10 de la distribución de los datos.

V. DISCUSIÓN

Los astrocitos son parte activa del sistema endocanabinoide en la amígdala central

Los endocanabinoides han sido ampliamente estudiados tanto en sus efectos sobre la transmisión sináptica como en sus efectos en la modulación del comportamiento. Originalmente se estudió su actuación directa sobre receptores de endocanabinoides neuronales (Shen, Piser et al. 1996, Szabo, Muller et al. 1999, Zimmer, Zimmer et al. 1999, Kreitzer and Regehr 2001, Wilson and Nicoll 2001). El efecto del sistema eCBs sobre la transmisión sináptica se ha estudiado ampliamente (Isaac, Hjelmstad et al. 1996, Kreitzer and Regehr 2001, Wilson and Nicoll 2001). Además se ha demostrado su importancia en la amígdala (Marsicano, Wotjak et al. 2002, Azad, Kurz et al. 2008, Kamprath, Romo-Parra et al. 2011, Ramikie and Patel 2012, Ramikie, Nyilas et al. 2014); aunque los astrocitos no se habían incluido como parte integral de este sistema en la amígdala, como si se había hecho en otras áreas (Navarrete and Araque 2008, Navarrete and Araque 2010, Han, Kesner et al. 2012, Min and Nevian 2012, Bosier, Bellocchio et al. 2013, Martin, Bajo-Graneras et al. 2015). Nuestros resultados demuestran que los astrocitos son parte funcional del sistema endocanabinoide en la amígdala. Así, estos responden a la liberación de endocanabinoides por las neuronas de CeM aumentando sus niveles de calcio intracelular. Demostramos que esta señal de calcio en respuesta a la liberación de endocanabinoides por parte de las neuronas de CeM no es solo dependiente de receptores de endocanabinoides CB1, sino que, gracias al uso de animales modificados genéticamente en los que se bloquea la expresión de estos receptores específicamente en astrocitos, demostramos la implicación de receptores CB1 astrocitarios. De esta manera demostramos que los endocanabinoides son capaces de actuar tanto en las neuronas como en los astrocitos de CeA. Recientemente se ha demostrado la actuación de eCBs sobre las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas de la amígdala central, quedando esta actuación modificada tras procesos de condicionamiento el miedo (Kamprath, Romo-Parra et al. 2011). Así, la alteración de la valencia emocional de distintos estímulos afecta a la función del sistema endocanabinoide en la amígdala. Al colocar a los astrocitos como parte del sistema endocanabinoide en la amígdala, nuestro estudio abre la puerta al estudio de la posible modificación de la implicación de los astrocitos en el sistema endocanabinoide tras

procesos de condicionamiento del miedo o en distintos estados emocionales tanto fisiológicos como patológicos.

Además, tras la activación de los astrocitos de CeM por eCBs, estos son capaces de regular la transmisión sináptica mediante la liberación de los gliotransmisores ATP o adenosina. De esta forma la movilización de eCBs por las neuronas de CeM activa a los astrocitos los cuales provocan como respuesta una modulación de la actividad sináptica. Esta modulación es diferencial, disminuyendo la transmisión sináptica excitadora y aumentando la transmisión sináptica inhibitoria. Es importante señalar que en otras áreas cerebrales se demostró que la actividad de los receptores CB1 astrocitarios estaba relacionada con la liberación del gliotransmisor glutamato (Navarrete and Araque 2010, Han, Kesner et al. 2012, Min and Nevian 2012, Gomez-Gonzalo, Navarrete et al. 2015, Martin, Bajo-Graneras et al. 2015); en cambio nuestros resultados revelan que la activación de los receptores CB1 astrocitarios en CeM produce la liberación del gliotransmisor ATP, que actúa en receptores de adenosina pre sinápticos.

Recientemente se ha demostrado la implicación de los receptores CB1 en la modulación de los EPSCs e IPSCs en CeA (Kamprath, Romo-Parra et al. 2011, Ramikie, Nyilas et al. 2014). En diversos estudios se observan resultados difíciles de reconciliar; por un lado la DSE necesita de despolarizaciones neuronales más largas que la DSI (Kamprath, Romo-Parra et al. 2011), pero por otro lado cuando se aplican agonistas de receptores de CB1 se observa una depresión clara de los EPSCs mientras que los IPSCs muestran un comportamiento variable (Ramikie, Nyilas et al. 2014). Así aparece una aparente contradicción entre el efecto observado por la liberación de eCBs y su efecto directo sobre las terminales pre sinápticas y la aplicación de agonistas exógenos del receptor de CB1. Los resultados de nuestro trabajo podrían reconciliar estos resultados, implicando a los astrocitos en la depresión observada sobre los EPSCs por la perfusión de agonistas de CB1 y aumentando la variabilidad en los IPSCs al aparecer en estas sinapsis una depresión mediante la activación directa de los receptores CB1 neuronales y una potenciación a través de la activación de los receptores CB1 astrocitarios. En cambio, en el caso de la DSI el efecto astrocitario

podría estar enmascarado por el efecto directo de los endocannabinoides sobre los receptores pre sinápticos. Este es un ejemplo de cómo la inclusión de los astrocitos como parte activa de los circuitos neuronales y el sistema endocanabinoide puede ayudar a clarificar resultados aparentemente contradictorios.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la implicación de los astrocitos en el sistema endocanabinoide en la amígdala, situándolos como posibles dianas de estudio para posteriores investigaciones sobre el papel de dicho sistema en la amígdala central y las funciones de procesamiento y transmisión de la información de las que esta área es responsable. Además nuestros resultados sitúan a los astrocitos como posible diana para el estudio del efecto de los agonistas exógenos de los receptores de eCBs, como el THC, y sus efectos sobre el miedo y la ansiedad.

Los astrocitos son elementos reguladores de la actividad sináptica y neuronal en la amígdala

Nuestros resultados demuestran un papel astrocitario en la regulación de la transmisión sináptica en la amígdala. Los astrocitos de CeM activados, tanto por estímulos endógenos como por estímulos exógenos selectivos, son capaces de regular la actividad sináptica inhibitoria y excitadora de CeM de manera diferencial; de forma que los astrocitos regulan la actividad sináptica inhibitoria de las sinapsis GABAérgicas procedentes de CeL. Esta regulación de la actividad sináptica inhibitoria se realiza mediante la activación de receptores A2A pre sinápticos que aumentan la probabilidad de liberación en estas sinapsis. En cambio los astrocitos regulan la actividad sináptica excitadora de las sinapsis glutamatérgicas procedentes de BLA mediante la activación de receptores A1 pre sinápticos, disminuyendo la probabilidad de liberación. Así la activación de los astrocitos genera una respuesta diferencialmente opuesta, aumentando la inhibición y disminuyendo la excitación. Tanto la implicación de los astrocitos en la regulación de la transmisión sináptica en CeM como la modulación diferencial de las sinapsis excitadoras e inhibitorias observadas tras la

activación de los astrocitos por un estímulo endógeno pueden ser reproducidas mediante la activación selectiva de los astrocitos por CNO, el agonista exógeno de los DREADDs. Este resultado sugiere que el efecto en la transmisión sináptica de la activación de los astrocitos es un efecto general, quizás independiente del estímulo que provoca la activación astrocitaria. Se necesitan estudios posteriores para elucidar la capacidad de respuesta de los astrocitos de CeM a otros estímulos, como pueden ser moléculas neuromoduladoras, tales como la vasopresina, dopamina o noradrenalina, y las posibles consecuencias que la activación de los astrocitos por estas sustancias produciría en la transmisión sináptica.

Mediante registros de IPSCs evocados en CeL, y EPSCs evocados en BLA, en la misma célula, demostramos que la regulación astrocitaria de la transmisión sináptica diferencialmente opuesta sobre IPSCs y EPSCs se puede producir sobre la misma célula. Esto nos indica que no aparecen distintas poblaciones neuronales en las que se modulen de manera diferencial los IPSCs y los EPSCs, si no que estas ocurren sobre distintas terminales que contactan con una misma neurona. Estos resultados sugieren que el aumento de la inhibición y disminución de la excitación sobre la misma neurona provocan una disminución de la excitabilidad en las neuronas de CeM, efecto capaz de explicar los resultados observados tanto con los registros in vivo como con el miedo condicionado.

Así, utilizando métodos quimiogénéticos para la activación de los astrocitos demostramos que su actividad genera un descenso en la excitabilidad de las neuronas de CeM y disminuye el miedo condicionado dependiente de la actividad de esta área. Es interesante que tanto el efecto observado con registros electrofisiológicos en rodaja como el efecto observado en el miedo condicionado apuntan a una modulación a corto plazo. Consistentemente, la activación de los astrocitos genera una modulación en la transmisión sináptica transitoria sin inducir fenómenos de plasticidad sináptica, y la activación astrocitaria in vivo genera una disminución de la expresión del miedo el día de la aplicación de CNO pero no al día siguiente. Estos resultados demuestran pues que la actividad de los astrocitos regula la actividad

sináptica en esta área situándolos como posibles dianas de posteriores estudios en la modulación de la actividad de la amígdala y sus manifestaciones conductuales asociadas al miedo y a la ansiedad, cuyas alteraciones pueden desembocar en estados patológicos como el síndrome de estrés postraumático.

Actividad astrocitaria en CeM: Posible mecanismo homeostático regulador de la actividad neuronal.

La movilización neuronal de endocannabinoides se puede producir en respuesta a la actividad sináptica (Ohno-Shosaku, Maejima et al. 2001, Alger and Kim 2011). Una intensa actividad sináptica puede generar despolarizaciones neuronales, presumiblemente mediante la activación de canales VGCC, entradas de calcio al terminal post sináptico y la activación de las enzimas encargadas de la movilización de los endocannabinoides (Alger and Kim 2011, Castillo, Younts et al. 2012, Ohno-Shosaku and Kano 2014). La movilización de estos eCBs pueden a su vez viajar de manera retrograda a los terminales pre sinápticos disminuyendo su actividad (Castillo, Younts et al. 2012). No obstante esta regulación homeostática directa de los eCBs posiblemente solo se produzca en las sinapsis liberadoras de los eCBs, debido a la dificultad de estos para difundir a sinapsis más lejanas y ejercer una función directa (Navarrete and Araque 2010). En cambio, al actuar sobre los astrocitos y aumentar sus niveles de calcio intracelular, estos pueden expandir la señal a otras sinapsis sobre la misma y sobre otras neuronas, que es el concepto de la modulación lateral astrocitaria (Covelo and Araque 2016). Así tras una alta actividad neuronal y la liberación de eCBs estos pueden afectar a la excitabilidad neuronal regional, expandiendo una señal que de otra forma sería más local. En concreto, nuestros resultados demuestran que los astrocitos de CeM no solo son capaces de ejercer este efecto mediante la disminución de la actividad excitadora glutamatérgica, sino que además son capaces de aumentar la actividad inhibitoria. Estos resultados sugieren que los astrocitos son capaces de producir un mecanismo homeostático regional, en el que la alta actividad neuronal activa a los astrocitos mediante la liberación de eCBs, y en respuesta, los astrocitos liberan gliotransmisores que disminuyen la excitabilidad del resto de la población neuronal de CeM. Este mecanismo astrocitario puede permitir

ajustar de manera regional y temporal la respuesta de las neuronas de CeM a distintos estímulos. Así los astrocitos pueden modificar el procesamiento y la transmisión de la información que llega a esta área regulando la actividad de sus aferentes sinápticos.

Regulación astrocitaria diferencial de la transmisión sináptica.

Nuestros resultados demuestran que la actividad de los astrocitos genera efectos opuestos sobre las sinapsis GABAérgicas procedentes de CeL y las sinapsis glutamatérgicas procedentes de BLA. Es el mismo estímulo el que en sendos casos genera, ya sea una potenciación de la transmisión sináptica inhibitoria, o bien una depresión de la transmisión sináptica excitadora. Nuestros resultados parecen indicar que en ambos procesos de regulación el comportamiento astrocitario es similar. De manera que la activación de los receptores CB1 astrocitarios aumenta los niveles de calcio astrocitarios mediante la movilización de calcio almacenado intracelularmente, lo que provoca la liberación de ATP o adenosina. Es el efecto de este gliotransmisor en diferentes receptores de las terminales inhibitorias o excitadoras lo que parece generar un efecto diferencial. Así, la potenciación de las sinapsis inhibitorias es dependiente de receptores A2A mientras que la depresión de las sinapsis glutamatérgicas depende de receptores A1. Estos resultados demuestran que la actividad astrocitaria evocada por un mismo estímulo es capaz de modular de manera diferencial y antagónica las sinapsis GABAérgicas y glutamatérgicas; de manera que la actividad de los astrocitos es capaz de modificar la actividad sináptica no de una manera global e inespecífica si no de manera específica, generando una modulación opuesta en distintas sinapsis, que puede afectar de manera global a la excitabilidad neuronal.

Podría considerarse pues que tras la activación astrocitaria, bien por eCBs bien por métodos quimiogénéticos, se produce una liberación de gliotransmisor que actuaría de manera inespecífica sobre los terminales pre sinápticos, cuyo perfil de expresión de receptores generaría la diferente regulación. Sin embargo estos resultados no son respaldados por los experimentos realizados aplicando adenosina mediante un pulso de presión. En estos experimentos se observaron efectos dependientes

de receptores A1 en las sinapsis GABAérgicas, además de efectos post sinápticos capaces de alterar la potencia sináptica. Estos resultados parecen indicar un mecanismo de acción más específico, en el que la liberación del gliotransmisor por parte de los astrocitos no actúa sobre todos los receptores presentes, afectando solo a receptores A2A en el terminal pre sináptico GABAérgico, sin generar efectos dependientes de receptores A1 pre ni post sináptico. Estos resultados son consistentes con resultados recientes que demuestran que el efecto de los astrocitos sobre la actividad sináptica y neuronal es específico y afecta a distintas sinapsis de manera selectiva (Martin, Bajo-Graneras et al. 2015, Tan, Liu et al. 2017).

El estudio de la comunicación de astrocitos y neuronas ha demostrado la función de la sinapsis tripartita y los efectos de la liberación de gliotransmisores en diversas regiones del sistema nervioso (Perea and Araque 2007, Carlsen and Perrier 2014, Perea, Yang et al. 2014, Martin, Bajo-Graneras et al. 2015, Scofield, Boger et al. 2015, Kronschlager, Drdla-Schutting et al. 2016), observando las diferencias en el efecto que la actividad astrocitaria produce sobre la actividad sináptica y neuronal. Estas diferencias normalmente se pueden atribuir a posibles diferencias en las poblaciones astrocitarias, neuronales o a las interacciones astrocito-neurona en distintas regiones. Si bien estas diferencias entre distintas regiones son importantes, pocos estudios han investigado las diferencias entre las distintas poblaciones neuronales de un mismo área (Martin, Bajo-Graneras et al. 2015, Tan, Liu et al. 2017) y nuestro estudio supone la primera aproximación al estudio de distintas entradas sinápticas sobre una misma población neuronal, así como de la investigación de los efectos que esta modulación sobre distintas entradas provoca sobre la actividad neuronal. En conjunto, los recientes estudios indican que la modulación de los astrocitos sobre la actividad neuronal no solo difiere entre distintas áreas, sino también en distintas poblaciones neuronales de la misma área y en distintas sinapsis de la misma población neuronal.

Implicación de los astrocitos en el miedo condicionado.

El papel de los astrocitos en la actividad sináptica ha sido estudiado en distintas regiones del sistema nervioso central (Perea and Araque 2007, Min and Nevian 2012, Perea, Yang et al. 2014, Martin, Bajo-Graneras

et al. 2015, Morquette, Verdier et al. 2015). Así mismo, se han demostrado efectos en el comportamiento tras la perturbación de la actividad astrocitaria (Han, Kesner et al. 2012, Saab, Neumeyer et al. 2012, Agulhon, Boyt et al. 2013, Oliveira, Sardinha et al. 2015, Scofield, Boger et al. 2015, Barca-Mayo, Pons-Espinal et al. 2017).

Para cualquier comportamiento animal numerosas áreas cerebrales están implicadas en la recepción y procesamiento de la información y en la posterior elaboración de la respuesta adecuada. Así es para el aprendizaje y la posterior expresión del miedo condicionado. La información de los estímulos condicionados y no condicionados es recibida por los sistemas sensoriales, que transmiten la información a las áreas sensoriales que después comunican con la amígdala, donde se producen los fenómenos de plasticidad encargados del aprendizaje, de la relación del estímulo condicionado con el no condicionado. Tras volver a presentar el estímulo condicionado este vuelve a pasar por las áreas sensoriales que comunican con la amígdala, la que a su vez comunica con las áreas efectoras de los comportamientos asociados con el miedo. Así, modificaciones en cada una de estas áreas por las que viaja la información, o incluso en otras áreas no directamente encargadas del procesamiento o la transmisión de la información procedente del estímulo condicionado, pueden alterar la expresión conductual del miedo. En cada una de estas, los astrocitos pueden estar desempeñando un papel distinto, comunicándose con las neuronas mediante la liberación de distintos gliotransmisores que pueden producir distintos efectos sobre la actividad de las poblaciones neuronales. Es por ello que tenemos que tener cautela a la hora de observar los efectos que las modificaciones globales en la actividad astrocitaria producen en la expresión de determinados comportamientos observables. Por este motivo, para investigar específicamente la función de los astrocitos de CeM sobre el miedo condicionado hemos utilizado herramientas quimiogénicas (DREADDs), expresados específicamente en astrocitos de CeM. La actividad de CeM se relaciona de manera directa con la expresión del *freezing*, una de las medidas conductuales más asociadas al miedo. Tras activar los astrocitos de CeM observamos una disminución en el miedo condicionado, resultado consistente con el efecto en la transmisión sináptica observada en rodajas de cerebro de ratón y en el descenso en la excitabilidad observada en registros in vivo. La modulación de la

transmisión sináptica que provocaba un aumento de la inhibición y una disminución de la excitación se producía por la liberación de los gliotransmisores ATP o adenosina tras el incremento de la actividad astrocitaria. No obstante, el efecto observado tanto en registros in vivo como en el comportamiento podría explicarse por esta regulación sináptica diferencial producida por la liberación de gliotransmisores, aunque no se puede excluir que la activación de los astrocitos de CeM produzca otros efectos in vivo que contribuyan a la observación de estos fenómenos. Es importante señalar que en nuestros resultados no solo se aprecia un descenso en la expresión del miedo sino que también observamos un aumento en la extinción del miedo. Consistentemente, este resultado es el opuesto al observado por otros laboratorios, que al bloquear los receptores CB1 en CeA observan un aumento de la expresión del miedo condicionado y una disminución en la extinción del mismo (Kamprath, Romo-Parra et al. 2011). La contribución de los receptores CB1 astrocitarios a este efecto, producido por el bloqueo global de los receptores CB1 en CeA aún tiene que ser investigado, pero nuestro estudio sitúa a los astrocitos como posibles candidatos a jugar un papel importante en esta modulación del miedo condicionado dependiente de receptores CB1 en CeA.

A diferencia de otros estudios en el comportamiento tras la alteración global de la actividad astrocitaria, nuestro estudio provee una visión a distintos niveles en la amígdala central, demostrando el efecto de la activación específica de los astrocitos de CeM tanto en la transmisión sináptica como en la actividad neuronal y su comportamiento asociado. Demostramos que la activación de los astrocitos puede ser evocada por estímulos tanto endógenos como exógenos y que el efecto de los agonistas exógenos produce un efecto en la actividad tanto a nivel sináptico como un efecto global en la actividad neuronal de la porción medial de la amígdala central y en la expresión del miedo condicionado.

Posible relevancia clínica de la función astrocitaria en la porción medial de la amígdala central.

La amígdala desempeña un papel crucial en el procesamiento de estímulos con valencia emocional tanto positiva como negativa. Su estructura y función aparece largamente conservada a nivel evolutivo (McDonald 1998) permitiendo que los experimentos obtenidos en

distintas especies (incluidos seres humanos) hayan generado resultados ampliamente análogos (Dejean, Courtin et al. 2015, Janak and Tye 2015). Por ejemplo, el proceso de condicionamiento del miedo genera un aumento en la actividad de LA en respuesta al estímulo condicionado tanto en ratones (Quirk, Repa et al. 1995) como en humanos (medido con resonancia magnética funcional) (Buchel, Morris et al. 1998, LaBar, Gatenby et al. 1998, Morris, Ohman et al. 1998). También se han encontrado similitudes entre humanos y roedores en desordenes patológicos, como el trastorno de ansiedad generalizada, en el que aparece una alteración en la conectividad entre BLA y CeM (Etkin, Prater et al. 2009) que puedes ser reproducida en roedores (Tye, Prakash et al. 2011). A nivel patológico cabe destacar el síndrome de estrés post-traumático (PTSD, del inglés *post traumatic stress disorder*) al ser uno de los trastornos de ansiedad más habitual y que aparece tras las experimentación de sucesos traumáticos. En pacientes con PTSD aparece una actividad anormalmente elevada en la amígdala (LaBar, Gatenby et al. 1998, Liberzon, Taylor et al. 1999, Shin, Orr et al. 2004) y parece que su aparición se relaciona con un déficit en la extinción del miedo condicionado (LaBar, Gatenby et al. 1998). Así, la amígdala en humanos también se sitúa como un área central en el procesamiento de estímulos aversivos y su actividad aparece alterada en condiciones patológicas. El trabajo presentado en esta tesis muestra que los astrocitos regulan la actividad de la principal estructura de salida de información de la amígdala, por lo que potencialmente sitúa a los astrocitos de esta área como una posible diana farmacológica para los estudios sobre el PTSD y los trastornos de ansiedad generalizada. Además este estudio sienta las bases para futuros estudios sobre el papel de los astrocitos sobre otros procesos en los que la amígdala centra también juega un importante papel, como son la alimentación (Cai, Haubensak et al. 2014) y los fenómenos de adicción (Warlow, Robinson et al. 2017).

VI. CONCLUSIONES

1. Los astrocitos de CeM responden con aumentos de calcio a los eCBs movilizados de manera endógena.
2. La activación de los receptores CB1 astrocitarios genera un aumento en la probabilidad de liberación de las sinapsis inhibitoras CeL-CeM.
3. La activación de los receptores CB1 astrocitarios genera una disminución en la probabilidad de liberación de las sinapsis excitadoras BLA-CeM
4. La modulación diferencial de las sinapsis CeL-CeM y BLA-CeM aparece en una misma neurona de CeM.
5. La aplicación de adenosina es incapaz de replicar exactamente los efectos observados tras la activación astrocitaria.
6. La activación de los receptores Gq-DREADDs en los astrocitos genera aumentos de calcio.
7. La modulación astrocitaria diferencialmente opuesta de las sinapsis de CeM observada por la activación por un estímulo endógeno puede ser reproducida mediante un estímulo selectivo exógeno (DREADDs).
8. La activación persistente de los receptores DREADDs genera un aumento tónico en la frecuencia de las oscilaciones de calcio y en la regulación de la transmisión sináptica en CeM.
9. La activación selectiva de astrocitos de CeM *in vivo* genera un descenso en la frecuencia de potenciales de acción en CeM
10. La activación selectiva de astrocitos de CeM genera una disminución en la expresión del miedo condicionado.
11. La deficiencia en la señal de calcio astrocitaria genera un aumento en la expresión del miedo condicionado.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Agulhon, C., K. M. Boyt, A. X. Xie, F. Friocourt, B. L. Roth and K. D. McCarthy (2013). "Modulation of the autonomic nervous system and behaviour by acute glial cell Gq protein-coupled receptor activation in vivo." J Physiol **591**(22): 5599-5609.

Agulhon, C., T. A. Fiacco and K. D. McCarthy (2010). "Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling." Science **327**(5970): 1250-1254.

Alger, B. E. and J. Kim (2011). "Supply and demand for endocannabinoids." Trends Neurosci **34**(6): 304-315.

Amano, T., C. T. Unal and D. Pare (2010). "Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala." Nat Neurosci **13**(4): 489-494.

Araque, A., G. Carmignoto, P. G. Haydon, S. H. Oliet, R. Robitaille and A. Volterra (2014). "Gliotransmitters travel in time and space." Neuron **81**(4): 728-739.

Araque, A., E. D. Martin, G. Perea, J. I. Arellano and W. Buno (2002). "Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices." J Neurosci **22**(7): 2443-2450.

Araque, A., V. Parpura, R. P. Sanzgiri and P. G. Haydon (1999). "Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner." Trends Neurosci **22**(5): 208-215.

Auclair, N., S. Otani, P. Soubrie and F. Crepel (2000). "Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons." J Neurophysiol **83**(6): 3287-3293.

Azad, S. C., J. Kurz, G. Marsicano, B. Lutz, W. Zieglgansberger and G. Rammes (2008). "Activation of CB1 specifically located on GABAergic interneurons inhibits LTD in the lateral amygdala." Learn Mem **15**(3): 143-152.

Barca-Mayo, O., M. Pons-Espinal, P. Follert, A. Armirotti, L. Berdondini and D. De Pietri Tonelli (2017). "Astrocyte deletion of Bmal1 alters daily locomotor activity and cognitive functions via GABA signalling." Nat Commun **8**: 14336.

Barres, B. A. (2008). "The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease." Neuron **60**(3): 430-440.

Blanchard, D. C., G. Griebel, R. Pobbe and R. J. Blanchard (2011). "Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process." Neurosci Biobehav Rev **35**(4): 991-998.

Bosier, B., L. Bellocchio, M. Metna-Laurent, E. Soria-Gomez, I. Matias, E. Hebert-Chatelain, A. Cannich, M. Maitre, T. Leste-Lasserre, P. Cardinal, J. Mendizabal-Zubiaga, M. J. Canduela, L. Reguero, E. Hermans, P. Grandes, D. Cota and G. Marsicano (2013). "Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes." Mol Metab **2**(4): 393-404.

Botta, P., L. Demmou, Y. Kasugai, M. Markovic, C. Xu, J. P. Fadok, T. Lu, M. M. Poe, L. Xu, J. M. Cook, U. Rudolph, P. Sah, F. Ferraguti and A. Luthi (2015). "Regulating anxiety with extrasynaptic inhibition." Nat Neurosci **18**(10): 1493-1500.

Boury-Jamot, B., A. Carrard, J. L. Martin, O. Halfon, P. J. Magistretti and B. Boutrel (2016). "Disrupting astrocyte-neuron lactate transfer persistently reduces conditioned responses to cocaine." Mol Psychiatry **21**(8): 1070-1076.

Braga, M. F., V. Aroniadou-Anderjaska, J. Xie and H. Li (2003). "Bidirectional modulation of GABA release by presynaptic glutamate receptor 5 kainate receptors in the basolateral amygdala." J Neurosci **23**(2): 442-452.

Brown, S. P., S. D. Brenowitz and W. G. Regehr (2003). "Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids." Nat Neurosci **6**(10): 1048-1057.

Buchel, C., J. Morris, R. J. Dolan and K. J. Friston (1998). "Brain systems mediating aversive conditioning: an event-related fMRI study." Neuron **20**(5): 947-957.

Bushong, E. A., M. E. Martone, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman (2002). "Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains." J Neurosci **22**(1): 183-192.

Cai, H., W. Haubensak, T. E. Anthony and D. J. Anderson (2014). "Central amygdala PKC-delta(+) neurons mediate the influence of multiple anorexigenic signals." Nat Neurosci **17**(9): 1240-1248.

Carlsen, E. M. and J. F. Perrier (2014). "Purines released from astrocytes inhibit excitatory synaptic transmission in the ventral horn of the spinal cord." Front Neural Circuits **8**: 60.

Carrier, E. J., C. S. Kearn, A. J. Barkmeier, N. M. Breese, W. Yang, K. Nithipatikom, S. L. Pfister, W. B. Campbell and C. J. Hillard (2004). "Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism." Mol Pharmacol **65**(4): 999-1007.

Castillo, P. E., T. J. Younts, A. E. Chavez and Y. Hashimotodani (2012). "Endocannabinoid signaling and synaptic function." Neuron **76**(1): 70-81.

Caterina, M. J. and D. Julius (2001). "The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway." Annu Rev Neurosci **24**: 487-517.

Cedarbaum, J. M. and G. K. Aghajanian (1978). "Afferent projections to the rat locus coeruleus as determined by a retrograde tracing technique." J Comp Neurol **178**(1): 1-16.

Charles, A. C., J. E. Merrill, E. R. Dirksen and M. J. Sanderson (1991). "Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate." Neuron **6**(6): 983-992.

Chevalleyre, V. and P. E. Castillo (2003). "Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability." Neuron **38**(3): 461-472.

Chevalleyre, V., B. D. Heifets, P. S. Kaeser, T. C. Sudhof and P. E. Castillo (2007). "Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha." Neuron **54**(5): 801-812.

Chevalleyre, V., K. A. Takahashi and P. E. Castillo (2006). "Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS." Annu Rev Neurosci **29**: 37-76.

Ciocchi, S., C. Herry, F. Grenier, S. B. Wolff, J. J. Letzkus, I. Vlachos, I. Ehrlich, R. Sprengel, K. Deisseroth, M. B. Stadler, C. Muller and A. Luthi (2010). "Encoding of conditioned fear in central amygdala inhibitory circuits." Nature **468**(7321): 277-282.

Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper and S. J. Smith (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." Science **247**(4941): 470-473.

Covelo, A. and A. Araque (2016). "Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes." Neuroscience **323**: 62-66.

Davis, M. (1992). "The role of the amygdala in fear and anxiety." Annu Rev Neurosci **15**: 353-375.

Davis, M. (1998). "Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety?" Biol Psychiatry **44**(12): 1239-1247.

Dejean, C., J. Courtin, R. R. Rozeske, M. C. Bonnet, V. Dousset, T. Michelet and C. Herry (2015). "Neuronal Circuits for Fear Expression and Recovery: Recent Advances and Potential Therapeutic Strategies." Biol Psychiatry **78**(5): 298-306.

Delaney, A. J., J. W. Crane and P. Sah (2007). "Noradrenaline modulates transmission at a central synapse by a presynaptic mechanism." Neuron **56**(5): 880-892.

Devane, W. A., L. Hanus, A. Breuer, R. G. Pertwee, L. A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger and R. Mechoulam (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." Science **258**(5090): 1946-1949.

Di Castro, M. A., J. Chuquet, N. Liaudet, K. Bhaukaurally, M. Santello, D. Bouvier, P. Tiret and A. Volterra (2011). "Local Ca²⁺ detection and modulation of synaptic release by astrocytes." Nat Neurosci **14**(10): 1276-1284.

Dobrunz, L. E. and C. F. Stevens (1997). "Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses." Neuron **18**(6): 995-1008.

Dong, H. W., G. D. Petrovich and L. W. Swanson (2001). "Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis." Brain Res Brain Res Rev **38**(1-2): 192-246.

Dumont, E. C., M. Martina, R. D. Samson, G. Drolet and D. Pare (2002). "Physiological properties of central amygdala neurons: species differences." Eur J Neurosci **15**(3): 545-552.

Duvarci, S. and D. Pare (2014). "Amygdala microcircuits controlling learned fear." Neuron **82**(5): 966-980.

Etkin, A., K. E. Prater, A. F. Schatzberg, V. Menon and M. D. Greicius (2009). "Disrupted amygdalar subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder." Arch Gen Psychiatry **66**(12): 1361-1372.

Facchinetti, F., E. Del Giudice, S. Furegato, M. Passarotto and A. Leon (2003). "Cannabinoids ablate release of TNF α in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide." Glia **41**(2): 161-168.

Fiacco, T. A. and K. D. McCarthy (2004). "Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons." J Neurosci **24**(3): 722-732.

Gewirtz, J. C. and M. Davis (1997). "Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala." Nature **388**(6641): 471-474.

Giaume, C., A. Koulakoff, L. Roux, D. Holcman and N. Rouach (2010). "Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions." Nat Rev Neurosci **11**(2): 87-99.

Giaume, C. and K. D. McCarthy (1996). "Control of gap-junctional communication in astrocytic networks." Trends Neurosci **19**(8): 319-325.

Gil, Z., B. W. Connors and Y. Amitai (1999). "Efficacy of thalamocortical and intracortical synaptic connections: quanta, innervation, and reliability." Neuron **23**(2): 385-397.

Gilpin, N. W., M. A. Herman and M. Roberto (2015). "The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders." Biol Psychiatry **77**(10): 859-869.

Gomez-Gonzalo, M., G. Losi, A. Chiavegato, M. Zonta, M. Cammarota, M. Brondi, F. Vetri, L. Uva, T. Pozzan, M. de Curtis, G. M. Ratto and G. Carmignoto (2010). "An excitatory loop with astrocytes contributes to drive neurons to seizure threshold." PLoS Biol **8**(4): e1000352.

Gomez-Gonzalo, M., M. Martin-Fernandez, R. Martinez-Murillo, S. Mederos, A. Hernandez-Vivanco, S. Jamison, A. P. Fernandez, J. Serrano, P. Calero, H. S. Futch, R. Corpas, C. Sanfeliu, G. Perea and A. Araque (2017). "Neuron-astrocyte signaling is preserved in the aging brain." Glia **65**(4): 569-580.

Gomez-Gonzalo, M., M. Navarrete, G. Perea, A. Covelo, M. Martin-Fernandez, R. Shigemoto, R. Lujan and A. Araque (2015). "Endocannabinoids Induce Lateral Long-Term Potentiation of Transmitter Release by Stimulation of Gliotransmission." Cereb Cortex **25**(10): 3699-3712.

Gozzi, A., A. Jain, A. Giovannelli, C. Bertollini, V. Crestan, A. J. Schwarz, T. Tsetsenis, D. Ragozzino, C. T. Gross and A. Bifone (2010). "A neural switch for active and passive fear." Neuron **67**(4): 656-666.

Gray, T. S., M. E. Carney and D. J. Magnuson (1989). "Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release." Neuroendocrinology **50**(4): 433-446.

Grosche, J., V. Matyash, T. Moller, A. Verkhratsky, A. Reichenbach and H. Kettenmann (1999). "Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells." Nat Neurosci **2**(2): 139-143.

Han, J., P. Kesner, M. Metna-Laurent, T. Duan, L. Xu, F. Georges, M. Koehl, D. N. Abrous, J. Mendizabal-Zubiaga, P. Grandes, Q. Liu, G. Bai, W. Wang, L. Xiong, W. Ren, G. Marsicano and X. Zhang (2012). "Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD." Cell **148**(5): 1039-1050.

Han, S., M. T. Soleiman, M. E. Soden, L. S. Zweifel and R. D. Palmiter (2015). "Elucidating an Affective Pain Circuit that Creates a Threat Memory." Cell **162**(2): 363-374.

Hatten, M. E. and C. A. Mason (1990). "Mechanisms of glial-guided neuronal migration in vitro and in vivo." Experientia **46**(9): 907-916.

Haubensak, W., P. S. Kunwar, H. Cai, S. Ciocchi, N. R. Wall, R. Ponnusamy, J. Biag, H. W. Dong, K. Deisseroth, E. M. Callaway, M. S. Fanselow, A. Luthi and D. J. Anderson (2010). "Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear." Nature **468**(7321): 270-276.

Henneberger, C., T. Papouin, S. H. Oliet and D. A. Rusakov (2010). "Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes." Nature **463**(7278): 232-236.

Holtzclaw, L. A., S. Pandhit, D. J. Bare, G. A. Mignery and J. T. Russell (2002). "Astrocytes in adult rat brain express type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors." Glia **39**(1): 69-84.

Howlett, A. C., F. Barth, T. I. Bonner, G. Cabral, P. Casellas, W. A. Devane, C. C. Felder, M. Herkenham, K. Mackie, B. R. Martin, R. Mechoulam and R. G. Pertwee (2002). "International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors." Pharmacol Rev **54**(2): 161-202.

Hua, T., K. Vemuri, M. Pu, L. Qu, G. W. Han, Y. Wu, S. Zhao, W. Shui, S. Li, A. Korde, R. B. Laprairie, E. L. Stahl, J. H. Ho, N. Zvonok, H. Zhou, I. Kufareva, B. Wu, Q. Zhao, M. A. Hanson, L. M. Bohn, A. Makriyannis, R. C. Stevens and Z. J. Liu (2016). "Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1." Cell **167**(3): 750-762 e714.

Huang, Y. C., S. J. Wang, L. C. Chiou and P. W. Gean (2003). "Mediation of amphetamine-induced long-term depression of synaptic transmission by CB1 cannabinoid receptors in the rat amygdala." J Neurosci **23**(32): 10311-10320.

Huber, D., P. Veinante and R. Stoop (2005). "Vasopressin and oxytocin excite distinct neuronal populations in the central amygdala." Science **308**(5719): 245-248.

Isaac, J. T., G. O. Hjelmstad, R. A. Nicoll and R. C. Malenka (1996). "Long-term potentiation at single fiber inputs to hippocampal CA1 pyramidal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8710-8715.

Janak, P. H. and K. M. Tye (2015). "From circuits to behaviour in the amygdala." Nature **517**(7534): 284-292.

Johansen, J. P., L. Diaz-Mataix, H. Hamanaka, T. Ozawa, E. Ycu, J. Koivumaa, A. Kumar, M. Hou, K. Deisseroth, E. S. Boyden and J. E. LeDoux (2014). "Hebbian and neuromodulatory mechanisms interact to trigger associative memory formation." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(51): E5584-5592.

John, C. S., E. I. Sypek, W. A. Carlezon, B. M. Cohen, D. Ongur and A. J. Bechtholt (2015). "Blockade of the GLT-1 Transporter in the Central Nucleus of the Amygdala Induces both Anxiety and Depressive-Like Symptoms." Neuropsychopharmacology **40**(7): 1700-1708.

Kamprath, K., H. Romo-Parra, M. Haring, S. Gaburro, M. Doengi, B. Lutz and H. C. Pape (2011). "Short-term adaptation of conditioned fear responses through endocannabinoid signaling in the central amygdala." Neuropsychopharmacology **36**(3): 652-663.

Kang, J., L. Jiang, S. A. Goldman and M. Nedergaard (1998). "Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission." Nat Neurosci **1**(8): 683-692.

Kasai, H., M. Fukuda, S. Watanabe, A. Hayashi-Takagi and J. Noguchi (2010). "Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition." Trends Neurosci **33**(3): 121-129.

Katona, I. and T. F. Freund (2012). "Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain." Annu Rev Neurosci **35**: 529-558.

Katona, I., E. A. Rancz, L. Acsády, C. Ledent, K. Mackie, N. Hajos and T. F. Freund (2001). "Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission." J Neurosci **21**(23): 9506-9518.

Kreitzer, A. C. and W. G. Regehr (2001). "Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells." Neuron **29**(3): 717-727.

Krettek, J. E. and J. L. Price (1978). "A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections." J Comp Neurol **178**(2): 255-280.

Kronschlager, M. T., R. Drdla-Schutting, M. Gassner, S. D. Honsek, H. L. Teuchmann and J. Sandkuhler (2016). "Gliogenic LTP spreads widely in nociceptive pathways." Science **354**(6316): 1144-1148.

LaBar, K. S., J. C. Gatenby, J. C. Gore, J. E. LeDoux and E. A. Phelps (1998). "Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study." Neuron **20**(5): 937-945.

Lauckner, J. E., B. Hille and K. Mackie (2005). "The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19144-19149.

LeDoux, J. (2012). "Rethinking the emotional brain." Neuron **73**(4): 653-676.

LeDoux, J. E. (2000). "Emotion circuits in the brain." Annu Rev Neurosci **23**: 155-184.

LeDoux, J. E. (2014). "Coming to terms with fear." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(8): 2871-2878.

LeDoux, J. E., C. Farb and D. A. Ruggiero (1990). "Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala." J Neurosci **10**(4): 1043-1054.

LeDoux, J. E., J. Iwata, P. Cicchetti and D. J. Reis (1988). "Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear." J Neurosci **8**(7): 2517-2529.

Li, H., M. A. Penzo, H. Taniguchi, C. D. Kopec, Z. J. Huang and B. Li (2013). "Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit." Nat Neurosci **16**(3): 332-339.

Li, X., A. V. Zima, F. Sheikh, L. A. Blatter and J. Chen (2005). "Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP3)-receptor type 2-deficient mice." Circ Res **96**(12): 1274-1281.

Liberzon, I., S. F. Taylor, R. Amdur, T. D. Jung, K. R. Chamberlain, S. Minoshima, R. A. Koeppe and L. M. Fig (1999). "Brain activation in PTSD in response to trauma-related stimuli." Biol Psychiatry **45**(7): 817-826.

Lopez de Armentia, M. and P. Sah (2004). "Firing properties and connectivity of neurons in the rat lateral central nucleus of the amygdala." J Neurophysiol **92**(3): 1285-1294.

Lutz, B., G. Marsicano, R. Maldonado and C. J. Hillard (2015). "The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress." Nat Rev Neurosci **16**(12): 705-718.

Ma, Y. Y., B. R. Lee, X. Wang, C. Guo, L. Liu, R. Cui, Y. Lan, J. J. Balcita-Pedicino, M. E. Wolf, S. R. Sesack, Y. Shaham, O. M. Schluter, Y. H. Huang and Y. Dong (2014). "Bidirectional modulation of incubation of cocaine craving by silent synapse-based remodeling of prefrontal cortex to accumbens projections." Neuron **83**(6): 1453-1467.

Mackie, K. (2008). "Cannabinoid receptors: where they are and what they do." J Neuroendocrinol **20 Suppl 1**: 10-14.

Maren, S. (2001). "Neurobiology of Pavlovian fear conditioning." Annu Rev Neurosci **24**: 897-931.

Mariotti, L., G. Losi, M. Sessolo, I. Marcon and G. Carmignoto (2016). "The inhibitory neurotransmitter GABA evokes long-lasting Ca(2+) oscillations in cortical astrocytes." Glia **64**(3): 363-373.

Marsicano, G. and B. Lutz (1999). "Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain." Eur J Neurosci **11**(12): 4213-4225.

Marsicano, G., C. T. Wotjak, S. C. Azad, T. Bisogno, G. Rammes, M. G. Cascio, H. Hermann, J. Tang, C. Hofmann, W. Zieglgansberger, V. Di Marzo and B. Lutz (2002). "The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories." Nature **418**(6897): 530-534.

Martin, R., R. Bajo-Graneras, R. Moratalla, G. Perea and A. Araque (2015). "Circuit-specific signaling in astrocyte-neuron networks in basal ganglia pathways." Science **349**(6249): 730-734.

Martina, M., S. Royer and D. Pare (1999). "Physiological properties of central medial and central lateral amygdala neurons." J Neurophysiol **82**(4): 1843-1854.

Matsuda, L. A., S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young and T. I. Bonner (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." Nature **346**(6284): 561-564.

McDonald, A. J. (1982). "Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat." J Comp Neurol **208**(4): 401-418.

McDonald, A. J. (1998). "Cortical pathways to the mammalian amygdala." Prog Neurobiol **55**(3): 257-332.

Metna-Laurent, M. and G. Marsicano (2015). "Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors." Glia **63**(3): 353-364.

Metna-Laurent, M., E. Soria-Gomez, D. Verrier, M. Conforzi, P. Jegu, P. Lafenetre and G. Marsicano (2012). "Bimodal control of fear-coping strategies by CB(1) cannabinoid receptors." J Neurosci **32**(21): 7109-7118.

Min, R. and T. Nevian (2012). "Astrocyte signaling controls spike timing-dependent depression at neocortical synapses." Nat Neurosci **15**(5): 746-753.

Moldrich, G. and T. Wenger (2000). "Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study." Peptides **21**(11): 1735-1742.

Moreira, F. A., M. Grieb and B. Lutz (2009). "Central side-effects of therapies based on CB1 cannabinoid receptor agonists and antagonists: focus on anxiety and depression." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **23**(1): 133-144.

Morquette, P., D. Verdier, A. Kadala, J. Fethiere, A. G. Philippe, R. Robitaille and A. Kolta (2015). "An astrocyte-dependent mechanism for neuronal rhythogenesis." Nat Neurosci **18**(6): 844-854.

Morris, J. S., A. Ohman and R. J. Dolan (1998). "Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala." Nature **393**(6684): 467-470.

Nabavi, S., R. Fox, C. D. Proulx, J. Y. Lin, R. Y. Tsien and R. Malinow (2014). "Engineering a memory with LTD and LTP." Nature **511**(7509): 348-352.

Namburi, P., A. Beyeler, S. Yorozu, G. G. Calhoon, S. A. Halbert, R. Wichmann, S. S. Holden, K. L. Mertens, M. Anahtar, A. C. Felix-Ortiz, I. R. Wickersham, J. M. Gray and K. M. Tye (2015). "A circuit mechanism for differentiating positive and negative associations." Nature **520**(7549): 675-678.

Navarrete, M. and A. Araque (2008). "Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication." Neuron **57**(6): 883-893.

Navarrete, M. and A. Araque (2010). "Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes." Neuron **68**(1): 113-126.

Navarrete, M., A. Diez and A. Araque (2014). "Astrocytes in endocannabinoid signalling." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1654): 20130599.

Nedergaard, M. and A. Verkhratsky (2012). "Artifact versus reality--how astrocytes contribute to synaptic events." Glia **60**(7): 1013-1023.

Nunez, E., C. Benito, M. R. Pazos, A. Barbachano, O. Fajardo, S. Gonzalez, R. M. Tolon and J. Romero (2004). "Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study." Synapse **53**(4): 208-213.

Ohno-Shosaku, T. and M. Kano (2014). "Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission." Curr Opin Neurobiol **29**: 1-8.

Ohno-Shosaku, T., T. Maejima and M. Kano (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals." Neuron **29**(3): 729-738.

Oliveira, J. F., V. M. Sardinha, S. Guerra-Gomes, A. Araque and N. Sousa (2015). "Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior." Trends Neurosci **38**(9): 535-549.

Ostroff, L. E., M. K. Manzur, C. K. Cain and J. E. Ledoux (2014). "Synapses lacking astrocyte appear in the amygdala during consolidation of Pavlovian threat conditioning." J Comp Neurol **522**(9): 2152-2163.

Panatier, A., J. Vallee, M. Haber, K. K. Murai, J. C. Lacaille and R. Robitaille (2011). "Astrocytes are endogenous regulators of basal transmission at central synapses." Cell **146**(5): 785-798.

Penzo, M. A., V. Robert, J. Tucciarone, D. De Bundel, M. Wang, L. Van Aelst, M. Darvas, L. F. Parada, R. D. Palmiter, M. He, Z. J. Huang and B. Li (2015). "The paraventricular thalamus controls a central amygdala fear circuit." Nature **519**(7544): 455-459.

Perea, G. and A. Araque (2005). "Synaptic regulation of the astrocyte calcium signal." J Neural Transm (Vienna) **112**(1): 127-135.

Perea, G. and A. Araque (2007). "Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses." Science **317**(5841): 1083-1086.

Perea, G., A. Yang, E. S. Boyden and M. Sur (2014). "Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo." Nat Commun **5**: 3262.

Perez-Alvarez, A., M. Navarrete, A. Covel, E. D. Martin and A. Araque (2014). "Structural and functional plasticity of astrocyte processes and dendritic spine interactions." J Neurosci **34**(38): 12738-12744.

Petravicz, J., T. A. Fiacco and K. D. McCarthy (2008). "Loss of IP3 receptor-dependent Ca²⁺ increases in hippocampal astrocytes does not affect baseline CA1 pyramidal neuron synaptic activity." J Neurosci **28**(19): 4967-4973.

Piomelli, D. (2003). "The molecular logic of endocannabinoid signalling." Nat Rev Neurosci **4**(11): 873-884.

Quirk, G. J., C. Repa and J. E. LeDoux (1995). "Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat." Neuron **15**(5): 1029-1039.

Raastad, M., J. F. Storm and P. Andersen (1992). "Putative Single Quantum and Single Fibre Excitatory Postsynaptic Currents Show Similar Amplitude Range and Variability in Rat Hippocampal Slices." Eur J Neurosci **4**(1): 113-117.

Ramikie, T. S., R. Nyilas, R. J. Bluett, J. C. Gamble-George, N. D. Hartley, K. Mackie, M. Watanabe, I. Katona and S. Patel (2014). "Multiple mechanistically distinct modes of endocannabinoid mobilization at central amygdala glutamatergic synapses." Neuron **81**(5): 1111-1125.

Ramikie, T. S. and S. Patel (2012). "Endocannabinoid signaling in the amygdala: anatomy, synaptic signaling, behavior, and adaptations to stress." Neuroscience **204**: 38-52.

Rey, A. A., M. Purrio, M. P. Viveros and B. Lutz (2012). "Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA(B) receptors in the balance of GABAergic and glutamatergic neurotransmission." Neuropsychopharmacology **37**(12): 2624-2634.

Rodriguez, J. J., K. Mackie and V. M. Pickel (2001). "Ultrastructural localization of the CB1 cannabinoid receptor in mu-opioid receptor patches of the rat Caudate putamen nucleus." J Neurosci **21**(3): 823-833.

Roelofs, K. (2017). "Freeze for action: neurobiological mechanisms in animal and human freezing." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **372**(1718).

Roelofs, K., M. A. Hageraars and J. Stins (2010). "Facing freeze: social threat induces bodily freeze in humans." Psychol Sci **21**(11): 1575-1581.

Rogan, M. T., U. V. Staubli and J. E. LeDoux (1997). "Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala." Nature **390**(6660): 604-607.

Ruehle, S., F. Remmers, H. Romo-Parra, F. Massa, M. Wickert, S. Wortge, M. Haring, N. Kaiser, G. Marsicano, H. C. Pape and B. Lutz (2013). "Cannabinoid CB1 receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons: distinctive sufficiency for hippocampus-dependent and amygdala-dependent synaptic and behavioral functions." J Neurosci **33**(25): 10264-10277.

Saab, A. S., A. Neumeyer, H. M. Jahn, A. Cupido, A. A. Simek, H. J. Boele, A. Scheller, K. Le Meur, M. Gotz, H. Monyer, R. Sprengel, M. E. Rubio, J. W. Deitmer, C. I. De Zeeuw and F. Kirchhoff (2012). "Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination." Science **337**(6095): 749-753.

Salio, C., S. Doly, J. Fischer, M. F. Franzoni and M. Conrath (2002). "Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord." Neurosci Lett **329**(1): 13-16.

Schoonover, C. E., J. C. Tapia, V. C. Schilling, V. Wimmer, R. Blazeski, W. Zhang, C. A. Mason and R. M. Bruno (2014). "Comparative strength and dendritic organization of

thalamocortical and corticocortical synapses onto excitatory layer 4 neurons." J Neurosci **34**(20): 6746-6758.

Scofield, M. D., H. A. Boger, R. J. Smith, H. Li, P. G. Haydon and P. W. Kalivas (2015). "Gq-DREADD Selectively Initiates Glial Glutamate Release and Inhibits Cue-induced Cocaine Seeking." Biol Psychiatry **78**(7): 441-451.

Serrano, A., N. Haddjeri, J. C. Lacaille and R. Robitaille (2006). "GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression." J Neurosci **26**(20): 5370-5382.

Shen, M., T. M. Piser, V. S. Seybold and S. A. Thayer (1996). "Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures." J Neurosci **16**(14): 4322-4334.

Shin, L. M., S. P. Orr, M. A. Carson, S. L. Rauch, M. L. Macklin, N. B. Lasko, P. M. Peters, L. J. Metzger, D. D. Dougherty, P. A. Cannistraro, N. M. Alpert, A. J. Fischman and R. K. Pitman (2004). "Regional cerebral blood flow in the amygdala and medial prefrontal cortex during traumatic imagery in male and female Vietnam veterans with PTSD." Arch Gen Psychiatry **61**(2): 168-176.

Sloan, S. A. and B. A. Barres (2014). "Looks can be deceiving: reconsidering the evidence for gliotransmission." Neuron **84**(6): 1112-1115.

Stella, N. (2004). "Cannabinoid signaling in glial cells." Glia **48**(4): 267-277.

Stella, N. (2009). "Endocannabinoid signaling in microglial cells." Neuropharmacology **56 Suppl 1**: 244-253.

Szabo, B., T. Muller and H. Koch (1999). "Effects of cannabinoids on dopamine release in the corpus striatum and the nucleus accumbens in vitro." J Neurochem **73**(3): 1084-1089.

Tan, Z., Y. Liu, W. Xi, H. F. Lou, L. Zhu, Z. Guo, L. Mei and S. Duan (2017). "Glia-derived ATP inversely regulates excitability of pyramidal and CCK-positive neurons." Nat Commun **8**: 13772.

Tart, C. T. (1970). "Marijuana Intoxication - Common Experiences." Nature **226**(5247): 701-&.

Tovote, P., M. S. Esposito, P. Botta, F. Chaudun, J. P. Fadok, M. Markovic, S. B. Wolff, C. Ramakrishnan, L. Fenno, K. Deisseroth, C. Herry, S. Arber and A. Luthi (2016). "Midbrain circuits for defensive behaviour." Nature **534**(7606): 206-212.

Tovote, P., J. P. Fadok and A. Luthi (2015). "Neuronal circuits for fear and anxiety." Nat Rev Neurosci **16**(6): 317-331.

Tye, K. M., R. Prakash, S. Y. Kim, L. E. Fenno, L. Grose, H. Zarabi, K. R. Thompson, V. Gradinaru, C. Ramakrishnan and K. Deisseroth (2011). "Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety." Nature **471**(7338): 358-362.

Tye, K. M., G. D. Stuber, B. de Ridder, A. Bonci and P. H. Janak (2008). "Rapid strengthening of thalamo-amygdala synapses mediates cue-reward learning." Nature **453**(7199): 1253-1257.

Ullian, E. M., S. K. Sapperstein, K. S. Christopherson and B. A. Barres (2001). "Control of synapse number by glia." Science **291**(5504): 657-661.

Van Sickel, M. D., M. Duncan, P. J. Kingsley, A. Mouihate, P. Urbani, K. Mackie, N. Stella, A. Makriyannis, D. Piomelli, J. S. Davison, L. J. Marnett, V. Di Marzo, Q. J.

Pittman, K. D. Patel and K. A. Sharkey (2005). "Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors." Science **310**(5746): 329-332.

Ventura, R. and K. M. Harris (1999). "Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes." J Neurosci **19**(16): 6897-6906.

Vernadakis, A. (1996). "Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity." Prog Neurobiol **49**(3): 185-214.

Viviani, D., A. Charlet, E. van den Burg, C. Robinet, N. Hurni, M. Abatis, F. Magara and R. Stoop (2011). "Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala." Science **333**(6038): 104-107.

Volterra, A., N. Liaudet and I. Savtchouk (2014). "Astrocyte Ca(2)(+) signalling: an unexpected complexity." Nat Rev Neurosci **15**(5): 327-335.

Volterra, A. and J. Meldolesi (2005). "Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues." Nat Rev Neurosci **6**(8): 626-640.

Walz, W. (1989). "Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment." Prog Neurobiol **33**(4): 309-333.

Warlow, S. M., M. J. F. Robinson and K. C. Berridge (2017). "Optogenetic Central Amygdala Stimulation Intensifies and Narrows Motivation for Cocaine." J Neurosci **37**(35): 8330-8348.

Wilson, R. I. and R. A. Nicoll (2001). "Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses." Nature **410**(6828): 588-592.

Zhu, P. J. and D. M. Lovinger (2005). "Retrograde endocannabinoid signaling in a postsynaptic neuron/synaptic bouton preparation from basolateral amygdala." J Neurosci **25**(26): 6199-6207.

Zimmer, A., A. M. Zimmer, A. G. Hohmann, M. Herkenham and T. I. Bonner (1999). "Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5780-5785.

Zorec, R., A. Araque, G. Carmignoto, P. G. Haydon, A. Verkhratsky and V. Parpura (2012). "Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca2+ as a signalling route." ASN Neuro **4**(2).